

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT DE STRATÉGIES VACCINALES  
POUR LA LUTTE CONTRE LE VIRUS DU SYNDROME REPRODUCTEUR ET  
RESPIRATOIRE PORCIN, LE CIRCOVIRUS PORCIN ET  
*MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*

THÈSE  
PRÉSENTÉE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR  
ÉLODIE ROQUES

MARS 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*La plus grande gloire n'est pas de ne jamais tomber,  
mais de se relever à chaque chute*

Confucius

*On ne fait jamais attention à ce qui a été fait;  
on ne voit que ce qui reste à faire*

Marie Curie

*Few are those who see with their own eyes and feel with their own hearts*

Albert Einstein

## REMERCIEMENTS

Ce travail de doctorat ne peut se terminer sans remercier les personnes qui y ont contribué de près ou de loin. Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Docteur Denis Archambault pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser mon doctorat au sein de son laboratoire. Merci beaucoup pour votre confiance, vos conseils et votre bienveillance. J'ai beaucoup appris ces dernières années et vous en suis très reconnaissante.

Je tiens également à remercier mon co-directeur de recherche, le Docteur Martin Lessard, pour avoir supervisé les différents travaux d'immunisation chez les porcs, ainsi que le Docteur Carl Gagnon pour avoir supervisé la phase d'infection expérimentale. Merci pour vos conseils avisés.

Je remercie les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer le travail de cette thèse.

Un remerciement tout particulier à Marie-Claude St-Louis, assistante de recherche au laboratoire, pour ses précieux conseils techniques, son écoute et tout le travail fourni pour que ce projet soit mené à son terme.

Un grand merci à Andréa Gomez-Corredor et Aurélie Girard. Ces dernières années n'auraient pas été pareilles sans vous les filles !!! Merci d'avoir été là au quotidien pour partager les hauts comme les bas. Vous êtes deux femmes formidables.

Je voudrais aussi remercier Philippe Cournoyer. Merci pour ta bonne humeur et tes « jokes », ainsi que pour ton aide très appréciée lors des infections expérimentales. Merci pour ton amitié.



Je tiens à remercier mes amies rencontrées au cours de cette aventure. Chirine Toufaily, merci pour les nombreuses soirées philosophiques. Wafa Najyb, merci pour ta bonne humeur. Gabrielle Vernouillet, merci pour ton humour. Merci à vous les filles, j'ai vraiment passé de très bons moments en votre compagnie.

Merci au Docteur Monique Boily et à Denis Flipo. Sans vous, la pause du midi n'aurait pas été pareille.

Je souhaiterais remercier différentes personnes rencontrées au cours de ce doctorat. Tout d'abord Wilfried Saron pour son aide tout au long du projet. Je remercie Frédéric Beaudoin et Nedzad Music pour leurs précieux conseils techniques et leur aide apportée à différentes étapes du projet. Je remercie Mélanie Grondin, Sabrina Peiro, Isabelle Meunier et Amélie Bourget pour leur amitié et leur aide. Je remercie les étudiants de l'UQAM toujours prêts à donner un coup de main pour dépanner et pour leur soutien moral. Merci à Daniel Lemieux, Marie-Josée Carbonneau et Luc Dubé avec qui j'ai pu partager des expériences d'enseignement très enrichissantes. Un grand merci au personnel technique de l'animalerie du Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc de Lennoxville, de l'animalerie de la faculté de médecine vétérinaire de l'UdM à St-Hyacinthe et de l'animalerie de l'UQAM pour votre accueil et pour avoir pris soin des animaux.

Un grand merci à Marion Malinowski pour son amitié inconditionnelle depuis toujours.

Merci à toi, Julien Merle, pour avoir partagé toute ces années à mes côtés et m'avoir donné la motivation de continuer dans les moments difficiles.

Je tiens enfin à remercier ma famille, et plus particulièrement ma grand-mère Lucette Leinot, pour n'avoir jamais cessé de m'encourager.

Je remercie les différents organismes subventionnaires à savoir le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), la Fédération des Producteurs de Porcs du Québec (FPPQ), Agriculture et Agroalimentaire Canada, le Conseil pour le Développement de l'Agriculture du Québec (CDAQ) et les Conseils d'adaptation du porc de l'Alberta, du Manitoba et de la Saskatchewan, le Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP) ainsi que la fondation UQAM.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES .....	xv
RÉSUMÉ .....	xviii
PROBLÉMATIQUE .....	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	4
1.1 Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin.....	4
1.1.1 Historique .....	4
1.1.2 Prévalence et impact économique .....	5
1.1.3 Hôte naturel et mode de transmission.....	5
1.1.4 Période d'incubation.....	6
1.1.5 Signes cliniques .....	6
1.1.6 Lésions.....	7
1.1.7 Persistance .....	8
1.1.8 Diagnostic .....	9
1.1.9 Contrôle de l'infection.....	9
1.1.10 Co-infections.....	10
1.1.11 Taxonomie .....	10
1.1.12 Structure de la particule virale.....	11
1.1.13 Organisation génomique et transcription.....	12
1.1.14 Protéines non structurales .....	15
1.1.15 Protéines structurales .....	17
1.1.16 Variabilité du virus .....	20
1.1.17 Réplication du virus.....	21

1.1.18 Caractéristiques physiques.....	25
1.1.19 PRRSV et immunologie .....	25
1.1.20 Vaccination expérimentale .....	33
1.2 Le Circovirus porcin .....	37
1.2.1 Historique .....	37
1.2.2 Hôte naturel et transmission .....	38
1.2.3 Variabilité génétique et phylogénie .....	38
1.2.4 Prévalence et impact économique .....	39
1.2.5 Pathologie .....	39
1.2.6 Facteurs contribuant au développement des PCVAD .....	40
1.2.7 Contrôle de l'infection.....	42
1.2.8 Organisation génomique .....	43
1.2.9 Réplication.....	46
1.2.10 PCV2 et réponse immunitaire.....	46
1.3. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	48
1.3.1 Généralités sur les mycoplasmes .....	48
1.3.2 Historique et impact économique .....	49
1.3.3 Transmission.....	49
1.3.4 Signes cliniques et lésions .....	50
1.3.5 Contrôle de l'infection.....	51
1.3.6 Organisation génomique .....	52
1.3.7 Pathogenèse .....	53
1.3.8 Protéines d'adhérence .....	53
1.3.9 Réponse immunitaire et <i>M. hyopneumoniae</i> .....	56
1.3.10 Vaccins expérimentaux.....	58
1.4. Interaction entre le PRRSV, le PCV2 et <i>M. hyopneumoniae</i> .....	59
1.4.1 Le complexe respiratoire porcin .....	59
1.4.2 Interaction entre le PRRSV et <i>M. hyopneumoniae</i> .....	60
1.4.3 Interaction entre le PRRSV et le circovirus porcin .....	61

1.4.4 Interaction entre le <i>M. hyopneumoniae</i> et le circovirus porcin .....	62
--	----

## CHAPITRE II

IMMUNOGENIC PROPERTIES OF REPLICATING BUT NONDISSEMINATING ADENOVECTORS EXPRESSING STRUCTURAL PROTEINS OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS .....	63
---	----

2.1 Abstract .....	65
2.2 Introduction .....	66
2.3 Material and Methods .....	68
2.3.1 Viruses, cells and synthetic genes .....	68
2.3.2 Cloning of GP5 wild-type or mutated sequences in fusion with the M sequence.....	69
2.3.3 Construction of recombinant adenovectors (rAdVs) .....	69
2.3.4 Western blot assay .....	70
2.3.5 Recombinant GP5 production.....	71
2.3.6 Immunization of piglets.....	71
2.3.7 Antibody response to PRRSV .....	73
2.3.8 Statistical analyses.....	74
2.4 Results .....	74
2.4.1 Expression of recombinant adenovectors (rAdVs).....	74
2.4.2 Antibody (Ab) response in pig sera .....	75
2.4.3 Antibody response in pig bronchoalveolar lavage fluid (BALF) .....	76
2.5 Discussion .....	77
2.6 Acknowledgements .....	79

## CHAPITRE III

IMMUNOGENIC AND PROTECTIVE PROPERTIES OF GP5 AND M STRUCTURAL PROTEINS OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS EXPRESSED FROM REPLICATING BUT NONDISSEMINATING ADENOVECTORS .....	80
3.1 Abstract .....	82
3.2 Introduction .....	83



3.3 Material and Methods .....	86
3.3.1 Viruses, cells and synthetic genes .....	86
3.3.2 Cloning of GP5 wild-type or mutated sequences in fusion with the M sequence.....	86
3.3.3 Construction of recombinant adenoviruses (rAdV).....	87
3.3.4 Western blot assay .....	88
3.3.5 Recombinant GP5 production.....	89
3.3.6 Immunization of piglets and experimental challenge.....	89
3.3.7 Antibody response to PRRSV .....	91
3.3.8 Cellular immune response to PRRSV .....	92
3.3.9 RNA extraction and PRRSV real-time PCR .....	93
3.3.10 Statistical analyses.....	93
3.4 Results.....	94
3.4.1 Expression of recombinant adenoviruses (rAdV).....	94
3.4.2 Antibody (Ab) response in immunized pigs.....	95
3.4.3 Cellular immune response in pigs following immunization.....	97
3.4.4 Protective efficiency against PRRSV challenge.....	98
3.4.5 Viremia .....	101
3.5 Discussion .....	102
3.6 Acknowledgements.....	106
CHAPITRE IV	
ANTIBODY RESPONSES INDUCED IN MICE IMMUNIZED WITH RECOMBINANT ADENOVECTORS EXPRESSING CHIMERIC PROTEINS OF VARIOUS PORCINE PATHOGENS .....	
4.1 Abstract .....	108
4.2 Introduction.....	109
4.3 Material and methods.....	111
4.3.1 Viruses, cells and synthetic genes .....	111
4.3.2 Gene fusion and construction of AdVs.....	111

4.3.3 Western blot assay .....	112
4.3.4 Production of recombinant proteins.....	112
4.3.5 Immunization of mice.....	113
4.3.6 Antibody response .....	113
4.3.7 Statistical analysis.....	115
4.4 Results .....	115
4.4.1 Expression of recombinant adenovectors .....	115
4.4.2 Ab responses in mice immunized with AdVs expressing GP5 in fusion with various protein partners .....	116
4.4.3 The fusion protein orientation influences the Ab response in mice immunized with P97c and Cap proteins .....	119
4.5 Discussion .....	123
4.6 Acknowledgements .....	125
CHAPITRE V	
DISCUSSION .....	126
5.1 Développement d'une nouvelle stratégie vaccinale pour l'induction d'une réponse immunitaire optimale contre le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin.....	126
5.1.1 Voie mucoale et adénovecteurs.....	126
5.1.2 Réponse mucoale .....	128
5.1.3 Les protéines d'intérêt du PRRSV .....	130
5.1.4 Mutations de la protéine GP5 et réponse en anticorps neutralisants .....	131
5.1.5 Réponse cellulaire.....	134
5.1.6 PRRSV et ADE .....	135
5.1.7 Réponse induite par le vaccin inactivé .....	137
5.1.8 Perspective .....	139
5.2 Développement de vaccins bivalents contre les infections porcines mixtes.....	140
5.2.1 Diminution de la réponse en anticorps lors des fusions avec la GP5 .....	141
5.2.2 Réponses en anticorps neutralisants .....	141



5.2.3 Réponse cellulaire induite.....	142
5.2.4 Choix de la P97c pour établir une réponse protectrice contre <i>M.</i> <i>hyopneumoniae</i> .....	143
5.2.5 La portion C-terminale de la protéine d'adhésion P97 de <i>M.</i> <i>hyopneumoniae</i> : une molécule potentiellement adjuvante ? .....	144
CONCLUSION .....	150
APPENDICE A FIGURES SUPPLÉMENTAIRES.....	152
APPENDICE B ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	154
APPENDICE C PARTICIPATIONS À DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES.....	155
BIBLIOGRAPHIE .....	164

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Représentation graphique des causes probables d'infection au PRRSV. ....	6
1.2 Représentation schématique de la particule virale du PRRSV. ....	11
1.3 Représentation schématique de l'organisation génomique du PRRSV. ....	13
1.4 Mécanisme de transcription discontinue du PRRSV. ....	14
1.5 Représentation schématique des polyprotéines codées par l'ORF 1a et 1ab. ....	16
1.6 Représentation schématique du cycle de réplication du PRRSV. ....	24
1.7 Séquence des principaux événements viraux et immunologiques lors d'une infection par le PRRSV. ....	26
1.8 Représentation schématique de la GP5 du PRRSV. ....	28
1.9 Voie de signalisation de la production d'INF de type 1. ....	30
1.10 Représentation graphique des pathogènes interagissant avec le PCV2 lors de cas de PCVAD. ....	41
1.11 Représentation schématique du génome du PCV2. ....	45
1.12 Organisation génomique de la souche 232 de <i>M. hyopneumoniae</i> . ....	52
1.13 Séquence en acide aminés de la portion C-terminale de la P97 de <i>M.</i> <i>hyopneumoniae</i> souche 232. ....	54
2.1 Expression of recombinant adenovectors (rAdVs) <i>in vitro</i> . ....	75
2.2 Antibody responses in sera of pigs immunized with recombinant adenovectors. ....	76
2.3 Antibody responses in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of pigs immunized with recombinant adenovectors. ....	77
3.1 Expression of recombinant adenoviruses (rAdV) <i>in vitro</i> . ....	94
3.2 Antibody responses in pigs vaccinated with the recombinant adenoviruses. ....	96
3.3 Lymphocyte proliferative responses in pigs immunized with recombinant adenoviruses. ....	97

3.4 Antibody responses in pigs sera challenged with the PRRSV FMV09-1155278 strain.....	99
3.5 Antibody responses in bronchoalveolar lavage fluids of pigs challenged with the PRRSV FMV09-1155278 strain. ....	101
3.6 Viremia of pigs immunized with recombinant adenoviruses and challenged with the PRRSV FMV09-1155278 strain. ....	102
4.1 Expression of recombinant adenovectors (AdVs) <i>in vitro</i> . ....	116
4.2 Antibody responses in mice vaccinated with the recombinant adenovectors (AdVs) expressing M-GP5, Cap-GP5 or P97c-GP5. ....	118
4.3 P97c-specific antibody responses in mice vaccinated with the recombinant adenovectors (AdVs) expressing P97c, Cap, P97c-Cap or Cap-P97c. ....	120
4.4 Cap-specific antibody responses in mice vaccinated with the recombinant adenovectors (AdVs) expressing P97c, Cap, P97c-Cap or Cap-P97c. ....	121
4.5 Serum neutralizing antibody response specific to PCV2b in mice immunized with the recombinant adenovectors (AdVs) expressing P97c, Cap, P97c-Cap or Cap-P97c.....	122
A.1 Lymphoprolifération spécifique à la GP5 au jour 49 post-immunisation. ....	152

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Exemples de quelques vaccins commerciaux contre le PRRSV.....	10
1.2 Pourcentages d'identité des protéines codées par l'ORF 2 à l'ORF 7 de la souche LV avec les autres souches de références (Dea et al., 2000) .....	20
1.3 Comparaison entre les souches européennes et nord-américaines dans les nombre d'acides aminés et de sites de glycosylation des différentes protéines structurales du PRRSV (Dea et al., 2000).....	21
1.4 Liste des vaccins commerciaux disponibles pour lutter contre le PCV2.....	42
1.5 Liste des vaccins commerciaux contre <i>M. hyopneumoniae</i> .....	51
3.1 PRRSV specific neutralizing antibody titers in pigs at 21 day post challenge ..	100
A.1 Liste des principaux adjuvants ainsi que leurs modes d'action .....	153

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

aa	<i>Amino acids</i>
Ab	<i>Antibody</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Cap	Protéine de capside du PCV2
CCL	Chimiokine
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPM	Coups par minute
CTB	Sous-unité B de la toxine cholérique
CXCL	Chimiokine
DCs	Cellules dendritiques
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
EAV	Virus de l'artérite équine
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GP	Glycoprotéine
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
Ig	Immunoglobuline

IL	Interleukine
INF	Interféron
IPAF	<i>ICE-protease activating factor</i>
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
IRF	<i>Interferon response factor</i>
LDV	Virus élévateur de la lactate déshydrogénase
LV	Virus de lelystad
M	Protéine de matrice du VSRRP
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
Myd88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
N	Nucléocapside
NAb	<i>Neutralizing antibody</i>
NAIP5	<i>Neuronal apoptosis inhibitor protein 5</i>
NALP	<i>NACHT, LRR and PYD domains containing protein receptor</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
nsp	Protéine non structurale
OD	<i>Optical density</i>
OIE	Organisation mondiale de la santé animale
ORF	<i>Open reading frame</i>
OVA	Ovalbumine
P97c	Portion C-terminal de la protéine P97 de <i>M. hyopneumoniae</i>

PADRE	<i>Pan DR helper T cell epitope</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCV2	Circovirus porcin de type 2
PCVAD	<i>Porcine circovirus associated diseases</i>
PEP	Pneumonie enzootique du porc
PI	Post-infection
PRRs	<i>Pattern-recognition receptors</i>
PS	Protéase
rAdV	Adénovirus recombinant
rGP5	Protéine GP5 recombinante (produite chez <i>E. coli</i> )
SDPS	Syndrome de dépérissement post-sevrage
SRRP	Syndrome reproducteur et respiratoire porcin
SVF	Sérum de veau foetal
TCID <sub>50</sub>	<i>Tissue culture infectious dose 50</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumour necrosis factor</i>
VLP	<i>Virus-like particles</i>
VSRRP	Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin
WT	<i>Wild-type</i>



## RÉSUMÉ

La production porcine joue un rôle très important dans l'économie et l'alimentation de nombreux pays. En 2010, environ 1 billion de porcs ont été produits à une échelle mondiale. Cette intensification de l'élevage rend de plus en plus difficile le maintien d'une biosécurité optimale et démontre l'importance de développer des vaccins efficaces contre les pathogènes porcins. Les vaccins conventionnels sont à base d'organismes entiers vivants atténués ou inactivés par un processus chimique. Toutefois, un regain de la virulence pour les premiers types de vaccins, résultant alors en des maladies au lieu de la protection espérée, ou encore un processus inapproprié d'inactivation et une réponse immunitaire faible pour les deuxièmes sont d'autant d'inconvénients importants auxquels les intervenants en santé animale et les éleveurs sont confrontés. Le développement de nouvelles stratégies vaccinales est donc nécessaire afin de contrecarrer les inconvénients liés à l'utilisation des vaccins conventionnels.

Parmi les virus affectant les troupeaux porcins, le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (« Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus », PRRSV) demeure celui qui représente le plus gros défi. En effet, bien que le PRRSV soit bien caractérisé et que des outils de contrôle aient été mis en place, les infections par le PRRSV sont répandues dans le monde entier et les éclosions sont récurrentes. Les vaccins disponibles actuellement sur le marché ne permettent pas d'assurer une protection optimale et sécuritaire. Dans la première partie de cette thèse, nous avons proposé une alternative aux procédures vaccinales utilisées jusqu'à maintenant. Cette procédure, basée sur l'induction d'une immunité mucosale et systémique, est totalement innovatrice pour le contrôle du PRRSV. Pour cela, des vaccins sous-unitaires à base d'adénovirus recombinant (rAdVs) réplicatifs mais non disséminatifs ont été générés afin d'exprimer des protéines d'intérêt du PRRSV. Ces protéines étaient la protéine de matrice M et la glycoprotéine d'enveloppe GP5 qui est porteuse des épitopes neutralisants majeures. Différentes mutations ont été également introduites dans la GP5 (GP5m) afin d'augmenter la réponse immunitaire induite. Une stratégie de vaccination combinatoire rAdV/protéine recombinante GP5 (rGP5) a aussi été testée. Nos différentes stratégies de vaccinations ont permis de générer une réponse immunitaire spécifique chez le porc, la stratégie combinatoire rAdV/rGP5 permettant d'induire la meilleure réponse en anticorps. Cependant, suite à une infection expérimentale, les animaux ayant reçu une vaccination à base de rAdVs co-exprimant les protéines M et GP5m sont ceux chez lesquels la virémie était la plus faible.

La deuxième partie de cette thèse a consisté à développer des vaccins bivalents ciblant trois pathogènes impliqués dans une entité clinique appelée complexe respiratoire porcin. Ces trois pathogènes étaient le PRRSV, le circovirus porcin de type 2 (PCV2) associé principalement au syndrome de dépérissement post-sevrage (SDPS) et *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* qui est l'agent de la pneumonie enzootique. Des vaccins à base de rAdVs non réplcatifs ont été développés afin d'exprimer des protéines d'intérêt de chacun des pathogènes. Ces protéines sont la GP5 du PRRSV, la protéine de capsid (Cap) du PCV2 et la portion C-terminale de la protéine d'adhésion P97 (P97c) de *M. hyopneumoniae*. L'immunisation de souris par voie intramusculaire a permis de démontrer la capacité de ces différents vaccins bivalents à générer une réponse en anticorps spécifiques à chacun des antigènes. De plus, la P97c, lorsque fusionnée avec les protéines Cap ou GP5, a permis d'augmenter la réponse en anticorps dirigés contre ces protéines virales suggérant un effet immunopotentiateur de la P97c.

En conclusion, ces travaux ont permis de démontrer l'efficacité d'une nouvelle stratégie vaccinale pour lutter contre le PRRSV et l'immunogénicité de vaccins bivalents contre des pathogènes d'importance chez le porc. De plus, ils suggèrent que la protéine P97c de *M. hyopneumoniae* pourrait avoir un effet adjuvant.

**Mots clefs:** Virus du Syndrome Reproducteur et respiratoire porcin, Circovirus Porcin, *Mycoplasma hyopneumoniae*, adénovirus recombinant, protéines M et GP5, Cap, P97c, réponse immune, porc, souris.

## PROBLÉMATIQUE

Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (« Porcine Reproductive and Respiratory Syndrom », PRRS) est apparu à la fin des années 1980 en Europe et en Amérique du Nord (Keffaber, 1989). Depuis la maladie s'est propagée à travers le monde pour devenir l'une des infections les plus sérieuses de l'industrie porcine mondiale, provoquant des pertes économiques très importantes. Ces pertes ont été estimées en 2011 à 664 millions de dollars par an pour les États-Unis (Holtkamp et al., 2012). Le PRRS est caractérisé par des troubles respiratoires sévères (pneumonie), principalement chez les porcelets, ainsi que par des désordres reproducteurs chez les truies (avortement, diminution du nombre de porcelet), impliquant ainsi un manque à gagner important pour les éleveurs (Rossow, 1998). L'agent causal de la maladie est le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (« Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus », PRRSV) qui appartient à la famille des *Arteviridae* de l'ordre des *Nidovirales* (Snijder et Meulenberg, 1998). De nombreuses recherches ont permis d'améliorer nos connaissances sur cette infection, ce qui a résulté au développement de différents tests de sérodiagnostic, de mesures préventives contre la propagation du virus et de vaccins vivants atténués ou inactivés (Charerntantanakul, 2012). Cependant, le PRRSV représente toujours une menace sanitaire et économique pour les élevages indemnes ainsi que pour les élevages infectés chez lesquels s'installe une infection de nature enzootique. Le développement d'un vaccin sécuritaire capable d'induire une protection immunitaire optimale reste encore une des clefs afin d'enrayer la maladie.

Les première et deuxième parties de cette étude ont pour objectif de proposer une alternative innovatrice aux procédures vaccinales jusqu'alors utilisées pour contrer le PRRSV. En effet, jusqu'à ce jour les différentes approches expérimentales (vaccins à ADN, vecteurs viraux) ont été basées sur l'induction d'une réponse immunitaire

systémique. Bien qu'elles aient permis d'induire une réponse immunitaire cellulaire et humorale, ces stratégies n'ont pas prévenu l'infection (Cruz et al., 2010). Étant donné que le PRRSV induit une pathologie principalement après son interaction avec les muqueuses du tractus respiratoire, notre première hypothèse est donc que l'immunisation de porcs par voie parentérale (intramusculaire) et mucosale (intranasale) devrait permettre d'induire une réponse immunitaire optimale. Notre deuxième hypothèse est que l'utilisation d'adénovirus recombinants humain de sérotype 5, répliatifs mais non disséminatifs comme vecteurs vaccinaux devrait permettre une bonne production de nos antigènes aux sites d'intérêt. Le choix de la glycoprotéine d'enveloppe 5 (GP5) et de la protéine de matrice (M) du PRRSV ainsi que l'introduction de différentes mutations dans la GP5 devraient permettre une meilleure réponse du système immunitaire de l'hôte. La protéine GP5 a été choisie car elle est porteuse des épitopes neutralisants majeurs du PRRSV (Ostrowski et al., 2002) alors que la protéine M est associée à une forte réponse cellulaire du système immunitaire (Bautista et al., 1999). De plus, les protéines GP5 et M forment des hétérodimères permettant de générer une meilleure réponse du système immunitaires que lorsque la protéine GP5 est exprimée seule (Jiang et al., 2006b). Cette stratégie d'immunisation devrait donc permettre de générer une protection optimale contre le PRRSV.

Parmi les autres pathogènes du porc, le circovirus porcin de type 2 (PCV2) affecte aussi l'ensemble de la filière porcine. Le PCV2 est associé principalement au syndrome de dépérissement post-sevrage (SDPS) mais aussi à d'autres pathologies comme le syndrome de dermatite-néphrite, le complexe respiratoire porcin et des troubles de la reproduction. Ces pathologies variées ont été regroupées sous l'acronyme PCVAD (maladies associées au circovirus porcin de type 2 (Gillespie et al., 2009). De plus des facteurs secondaires (co-facteurs) augmentent la sévérité de l'infection au PCV2 comme le PRRSV ou *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* (Ramamoorthy et Meng, 2009). Les infections par *M. hyopneumoniae*, agent de la

pneumonie enzootique, sont très fréquentes. Des vaccins (bactérines) ont été développés; bien qu'ils protègent lors d'une infection, ils n'éliminent pas complètement la colonisation des tissus par le pathogène ou les lésions de pneumonie (Chae, 2011). Finalement, l'infection par *M. hyopneumoniae* augmente la sévérité et la durée des troubles respiratoires lors d'une co-infection avec le PRRSV. Le développement de vaccins bivalents contre ces différentes infections serait un atout pour les éleveurs et les intervenants en santé animale d'un point de vue économique tout en permettant des manipulations simplifiées chez les animaux pour l'administration de vaccins.

La troisième partie de cette thèse avait pour but de développer des vaccins bivalents pour lutter contre les infections porcines mixtes. Pour cela, des vaccins à base d'adénovirus recombinants non réplicatifs ont été développés afin d'exprimer des antigènes de chacun des pathogènes. Pour le PRRSV, la GP5 a été choisie pour les raisons mentionnées précédemment. Pour le PCV2, la protéine de capsid (Cap) est la protéine la plus immunogénique et est dotée d'une activité neutralisante (Blanchard et al., 2003). Chez *M. hyopneumoniae*, la protéine d'adhésion P97 qui induit des anticorps inhibant l'infectivité du pathogène a été choisie (Okamba et al., 2007). Cependant, seule la portion C-terminale de la protéine (P97c) sera utilisée car les régions impliquées dans l'adhérence du pathogène sont situées au niveau de cette extrémité (Hsu et Minion, 1998a). Dans le contexte d'une étude de preuve de concept, l'objectif est donc de déterminer, chez la souris, la capacité de vaccins bivalents exprimant des protéines chimériques à générer une réponse immunitaire spécifique. Cette approche vaccinale bivalente est toute nouvelle pour lutter contre les pathogènes porcins décrits ci-haut.



## **CHAPITRE I**

### **ÉTAT DES CONNAISSANCES**

#### **1.1 Le Virus du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin**

##### **1.1.1 Historique**

Les premiers signes d'une infection par le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (« Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus », PRRSV) ont été mis en évidence d'abord en Amérique du Nord en 1989 par Keffaber, puis en Europe en 1990 (Keffaber, 1989). En 1991, l'agent infectieux a été identifié lors d'une épidémie aux Pays-Bas et a alors été dénommé virus de Lelystad (Wensvoort et al., 1991). La présence du PRRSV au Québec a été démontrée pour la première fois en 1992 (Dea et al., 1992). Le PRRSV s'est propagé sur les continents Américain et Européen durant plusieurs années ainsi qu'à travers les pays asiatiques. Bien que le PRRSV n'ait été découvert qu'en 1995 en Chine (Chen et al., 2006b), il s'est répandu très rapidement avec des pics épidémiques pouvant entraîner des pertes très importantes, notamment en 2006 où 20% des 2 millions de porcs qui ont été infectés sont décédés très rapidement (Tian et al., 2007). Depuis son apparition, ce syndrome a reçu plusieurs appellations dont entre autre maladie mystérieuse du porc, maladie des oreilles bleues, "reproductive failure syndrome", "porcine endemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)", "swine infertility and respiratory syndrome (SIRS)", syndrome dysgénique et respiratoire porcin. L'appellation aujourd'hui reconnue par l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) est Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (« Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome », PRRS).

### 1.1.2 Prévalence et impact économique

Le PRRS est une maladie endémique à travers tous les pays producteurs de porcs (Cho et Dee, 2006). Cependant, d'après des données de l'OIE datant de 2008, l'Australie, la Nouvelle-Zélande, la Norvège, la Finlande, la Suède et la Suisse sont encore indemnes de cette infection. Les pertes économiques associées au PRRSV sont très importantes. Elles ont été estimées en 2011 à 664 millions de dollars par an aux États-Unis (Holtkamp et al., 2012) et à 150 millions de dollars pour l'industrie porcine canadienne dont 40 à 50 millions de dollars pour le Québec (Sirois, 2007).

### 1.1.3 Hôte naturel et mode de transmission

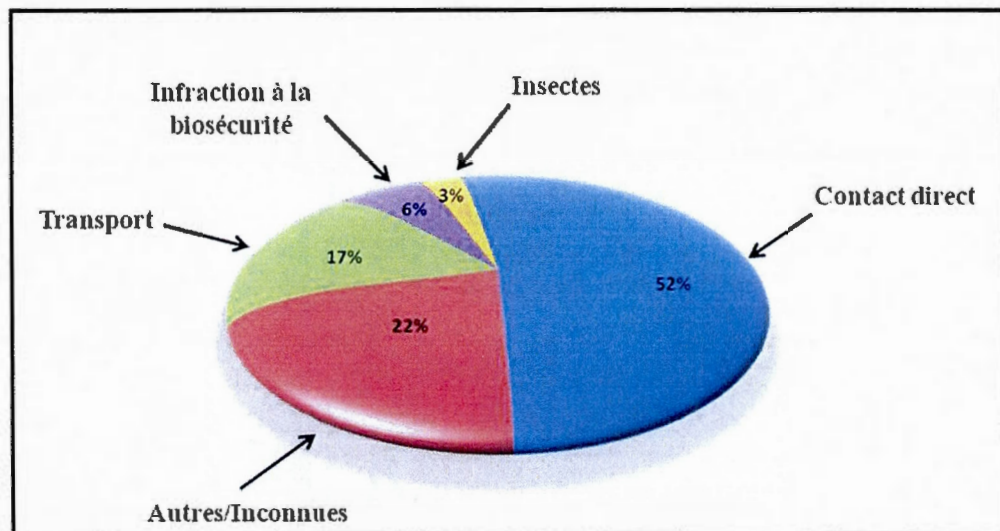
Les porcs et les sangliers sont les seuls animaux connus pour développer une infection naturelle due au PRRSV (Albina, 1997a). La transmission du virus peut se faire par voie directe ou indirecte (Figure 1.1).

✓ Mode de transmission directe : la voie de transmission principale du virus est le contact direct entre les animaux, notamment par l'interaction du virus avec les muqueuses du tractus respiratoire. Le virus se retrouve dans de nombreuses excréments et sécrétions des porcs contaminés comme le sang, le sperme, la salive, les fèces, les aérosols, le lait et le colostrum. Le PRRSV peut aussi se transmettre verticalement vers le milieu et la fin de la gestation (Wills et al., 1997).

✓ Mode de transmission indirecte : les matériaux contaminés tel que les bottes, les blouses et les seringues peuvent être à l'origine de la transmission de la maladie. Le transport des animaux dans des véhicules non nettoyés correctement est aussi une source potentielle de contamination (Pitkin et al., 2009a). Les insectes comme certains moustiques (*Aedes vexans*) ou mouches (*Musca domestica*) seraient également capables de transmettre la maladie bien qu'ils ne soient pas reconnus comme des vecteurs biologiques (Cho et Dee, 2006; Pitkin et al., 2009a). La



transmission entre les fermes via des aérosols a aussi été démontrée (Cho et al., 2007; Dee et al., 2009; Pitkin et al., 2009b).



**Figure 1.1 :** Représentation graphique des causes probables d'infection au PRRSV.

Le diagramme suivant représente le pourcentage de chacune des sources probables d'infection par le PRRSV. Figure adaptée de (Torremorell et al., 2004).

#### 1.1.4 Période d'incubation

La période d'incubation varie en fonction de la virulence de la souche mais aussi selon la voie d'infection et la quantité de virus qui infecte l'animal. Les premiers signes cliniques apparaissent en général après une période qui varie entre 3 à 37 jours (Dea et al., 1992). Par inoculation expérimentale, la plupart des animaux sont malades après seulement trois à quatre jours d'incubation.

#### 1.1.5 Signes cliniques

La nature et la gravité des signes cliniques varient selon la race, l'âge, le sexe, la souche de virus et sont variables dans le temps. Les signes cliniques peuvent être séparés en deux composantes, une composante sur la reproduction et une composante respiratoire.

✓ Les troubles de la reproduction : ils se caractérisent par des mises-bas prématurées ou un allongement anormal du temps de gestation, et par des avortements qui peuvent se produire tardivement (après 90 jours de gestation). Les portées affectées sont composées en partie de porcelets chétifs et de porcelets mort-nés, en plus des cas de momifications fœtales et de fœtus partiellement autolysés. Les porcelets infectés à la naissance développent entre autres des signes sévères de dyspnée, de l'inappétence et de la diarrhée. Le passage transplacentaire du virus se fait principalement en fin de gestation. Les signes cliniques des truies en gestation peuvent être de la fièvre, de l'anorexie, un état léthargique, une pneumonie, une agalactie ou bien il peut n'y avoir aucun symptôme (Rossow, 1998).

✓ Les troubles respiratoires : ils se caractérisent par une augmentation de la température corporelle (généralement inférieure à 42°C), de la toux, des éternuements et de la dyspnée dus à une pneumonie (Albina, 1997b). Le manque d'oxygène causé par la détresse respiratoire peut provoquer une cyanose au niveau des oreilles, du ventre et des extrémités. Les paupières sont enflées et on observe un écoulement oculaire aqueux. Les difficultés respiratoires entraînent aussi une diminution de la prise de poids et une augmentation de la mortalité (Wensvoort, 1993). Les souches nord-américaines semblent provoquer plus de problèmes respiratoires que les isolats européens. Certains isolats finalement ne provoquent pas de troubles respiratoires.

### 1.1.6 Lésions

Les lésions provoquées par une infection par le PRRSV sont aussi nombreuses et variées. Ces lésions ne sont pas toutes présentes chez un même individu et l'incidence lésionnelle dépend de la virulence de la souche (Albina, 1997b).

✓ Lésions de l'appareil respiratoire : au niveau des macrophages alvéolaires, la réplication lytique du virus entraîne une lésion inflammatoire de type pneumonie interstitielle. Des atteintes multifocales sont observées au niveau des lobes antérieurs des poumons (Dea et al., 1992) avec infiltration des cloisons alvéolaires par des

macrophages, des lymphocytes et éventuellement des polynucléaires neutrophiles (Collins et al., 1992). Dans certains cas, ces lésions peuvent s'accompagner d'une accumulation dans la lumière alvéolaire d'exsudats séro-protéiques, de macrophages et de débris cellulaires ainsi que par une hyperplasie cellulaire à pneumocytes de type II (Albina, 1997b). Les lésions sont plus invasives avec les souches nord-américaines qu'avec les souches européennes (Rossow et al., 1994).

✓ Lésions sur l'appareil reproducteur: le PRRSV provoque des lésions au niveau du placenta. Les placentas prennent une coloration grisâtre et des micro-séparations des couches épithéliales sont observées. Dans ces zones de micro-séparations, les cellules épithéliales se nécrosent et desquament (Stockhofe-Zurwieden et al., 1993). Des lésions de nature hémorragique au niveau du cordon ombilical ont également été observées. L'inflammation de l'endomètre et du myomètre est caractérisée par une infiltration de lymphocytes, de plasmocytes et de macrophages (Lager et Halbur, 1996).

### **1.1.7 Persistance**

Une infection persistante est une des caractéristiques des virus de la famille des *Arteviridae*. La durée de persistance du PRRSV a été documentée dans de nombreuses études mais les résultats sont très variables. De nombreux facteurs comme l'âge du porc lors de l'infection et la dose infectieuse influencent probablement la virémie (Van Reeth, 1997). Dans la plupart des expériences, il faut en moyenne 4 à 9 semaines pour que le système immunitaire élimine le virus du sang circulant. Le virus persiste également dans les poumons, les ganglions lymphatiques médiastinaux et les amygdales (Albina, 1997b). Certains auteurs ont montré que le virus pouvait être réexcrété plus de 14 semaines après l'infection (Albina et al., 1994).

### **1.1.8 Diagnostic**

Le diagnostic d'une infection par le PRRSV peut se faire de différentes façons. Il peut être basé sur l'observation de signes cliniques typiques ou l'apparition d'une séroconversion. Différents tests diagnostiques du PRRSV sont actuellement disponibles : les plus utilisés sont les tests d'ELISA IDEXX, la détection par immunofluorescence indirecte, l'isolement viral, l'immunohistochimie sur coupe de tissu, la détection par RT-PCR et le séquençage de l'ORF5 (« Open Reading Frame ») (Rossow, 1998).

### **1.1.9 Contrôle de l'infection**

Dans les zones où la prévalence est faible, des mesures de contrôle peuvent être proposées comme des mesures sanitaires en renforçant les bonnes pratiques d'élevage, notamment dans le domaine de l'hygiène. Dans les zones fortement infectées, il y a peu de chance de parvenir à éliminer l'infection sans vaccin. Différents vaccins existent à l'heure actuelle sur le marché qui sont soit des vaccins vivants atténués, soit des vaccins inactivés (Charerntantanakul, 2012). Les vaccins les plus couramment utilisés sont énumérés dans le tableau 1.1.

Cependant, les vaccins actuels ne proposent pas une protection optimale ou comportent des risques. En effet, bien que les vaccins vivants atténués permettent une protection sur le long terme, ils présentent un risque de réversion de la virulence (Madsen et al., 1998). Les vaccins inactivés sont plus sécuritaires mais ils induisent une protection moins efficace (Nielsen et al., 1997; Scotti et al., 2007).



**Tableau 1.1: Exemples de quelques vaccins commerciaux contre le PRRSV**

Type de vaccin	Nom	Compagnie	Souche virale
Vivant atténué	Ingelvac® PRRSV MLV	Boehringer	Souche nord-américaine VR2332
	Ingelvac® PRRSV ATP	Boehringer	Souche nord-américaine atypique parente de la souche JA142
	Amervac PRRSV®	Hipra	Souche européenne VP046BIS
	Porcilis PRRSV®	MSD Animal Health	Souche européenne DV
	ReproCyc® PRRS-PLE	Boehringer	Souche nord-américaine VR2332
	Pyrsvac-183®	Syva	Souche européenne All-183
Inactivé	Ingelvac® PRRSV KV	Boehringer	Souche européenne P120
	Suipravac-PRRSV®	Hipra	Souche européenne
	Suivac PRRS-IN	Dyntec	Souche européenne VD-E1, VD-E2 et VD-A1

### 1.1.10 Co-infections

Lors d'une infection par le PRRSV, d'autres agents pathogènes peuvent entrer en interaction. Il a été démontré que les porcs infectés par le PRRSV développent une prédisposition aux infections par *Streptococcus suis* (Galina et al., 1994). L'infection par le PRRSV peut aussi augmenter les effets pathologiques dus à une infection par le virus de la fièvre porcine (Van Reeth et al., 1996). La diminution des défenses immunitaires locales et générales engendre une grande fragilité aux autres agents pathogènes, en particulier aux agents respiratoires viraux comme le virus d'Aujeszki, et aux agents bactériens comme *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* et *Haemophilus parasuis* (Van Reeth, 1997).

### 1.1.11 Taxonomie

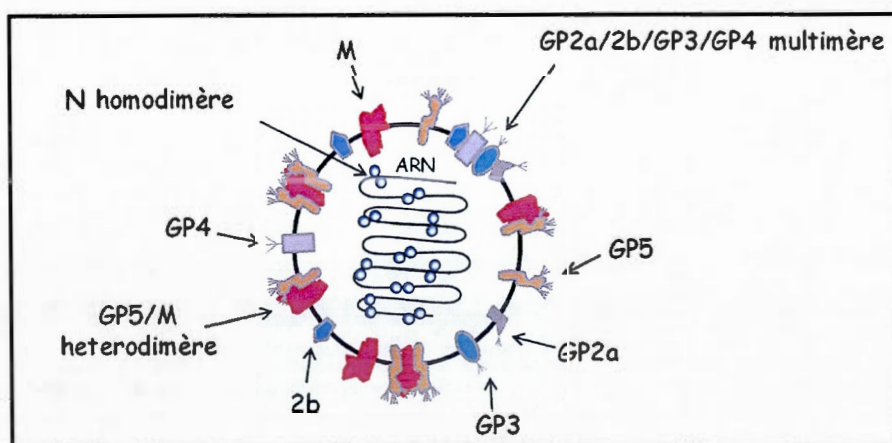
Basé sur des similarités au niveau de la morphologie, de l'organisation génomique, de sa stratégie de réplication et de transcription ainsi que de sa composition en protéine, le PRRSV a été classé dans la famille des *Arteriviridae* et dans le genre *Arterivirus*. Les autres membres de la famille des *Arteriviridae* sont le virus de l'artérite virale équine (EAV), le virus de l'élévation de la lactate déshydrogénase de la souris (LDV) et le virus de la fièvre hémorragique simienne (SHF) (Snijder et Meulenberg, 1998). Tous les membres de cette famille se

caractérisent par leurs propriétés à se répliquer dans les macrophages et à induire une infection persistante dans leur hôte naturel (Prieto et Castro, 2005). Les membres de cette famille appartiennent à l'ordre des *Nidovirales* avec les *Coronaviridae*, les *Toroviridae* et les *Roniviridae* (Wissink et al., 2005).

Les souches nord-américaines et européennes diffèrent de part leur virulence, leur antigénicité et leur propriété génique. Ces différences ont donné lieu à une classification des souches de PRRSV en deux groupes : le groupe I qui comprend la plupart des souches européennes est représenté par la souche Lelystad Virus (LV) et le groupe II qui regroupe la plupart des souches nord-américaines et qui est représenté par la souche VR2332 (Meng et al., 1995).

#### 1.1.12 Structure de la particule virale

Le PRRSV est un virus à morphologie pléomorphe de forme sphérique à ovale d'une taille d'environ 50 à 65 nm de diamètre. Il possède une surface extérieure lisse composée de quelques complexes protéiques d'enveloppe proéminents (Figure 1.2). L'enveloppe, composée d'une double couche lipidique, entoure le centre du virion d'une taille d'environ 39 nm qui est constitué d'une nucléocapside de type hélicoïdale (Spilman et al., 2009).

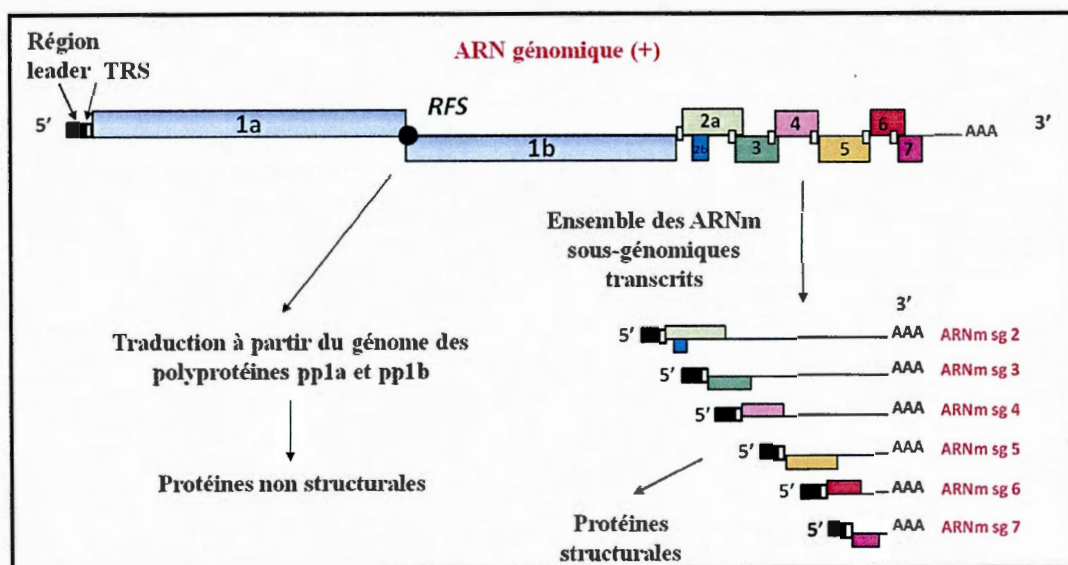


**Figure 1.2 : Représentation schématique de la particule virale du PRRSV.**  
Figure adaptée de (Meulenberg, 2000; Music et Gagnon, 2010).

### 1.1.13 Organisation génomique et transcription

Le matériel génétique du PRRSV est une molécule d'ARN simple brin de 15 Kb, de polarité positive et polyadénylé à son extrémité 3'. L'ARN viral est composé de neuf cadres de lectures ouverts (ORF) (Albina, 1997b). Les ORF 1a et 1b, qui représentent environ 75 % du génome, sont exprimés directement à partir de l'ARN génomique et codent pour la réplicase virale (Figure 1.3). La traduction de l'ORF1b, ne contenant pas de site d'initiation de la traduction, est possible grâce à deux éléments trouvés dans la région chevauchante des ORF1a/1b : un signal appelé séquence glissante ou RFS (ribosomal frameshift) qui permet le décalage du cadre de lecture du ribosome en -1 et en aval, la présence d'une structure en pseudonœud d'ARN (Meulenberg, 2000; Pasternak et al., 2006). Les ORFs 1a et 1b sont traduits sous forme de polyprotéines appelées pp1a et pp1ab qui vont être ensuite clivées par les protéases virales pour donner les protéines non structurales (nsp) (Fang et Snijder, 2010).



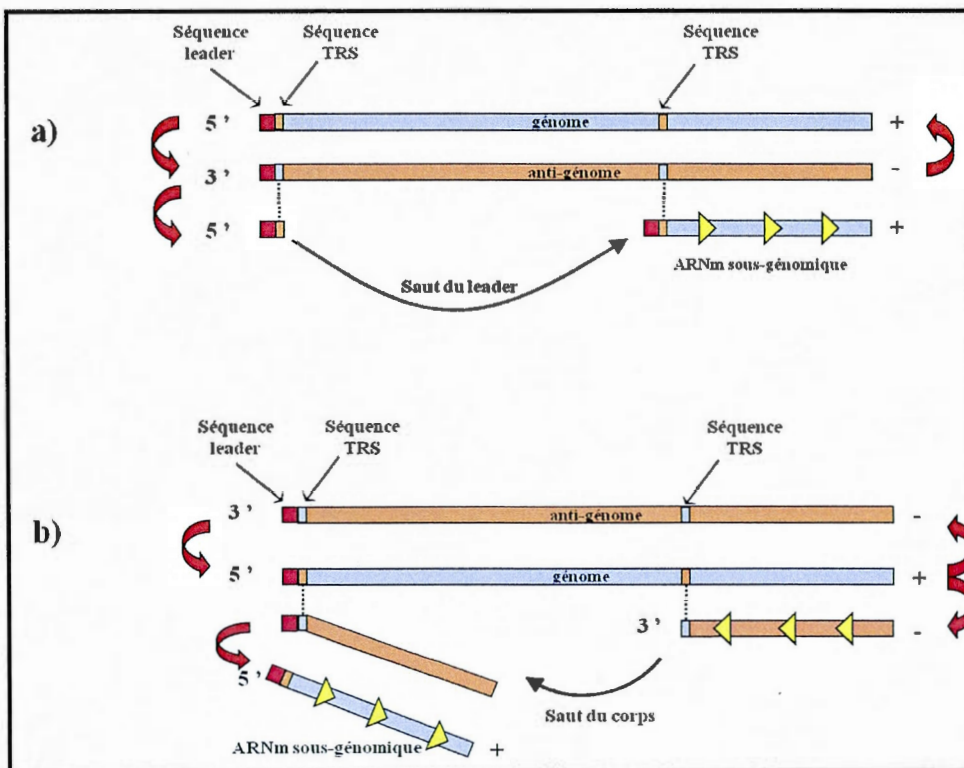


**Figure 1.3 :** Représentation schématique de l'organisation génomique du PRRSV.

Le génome du PRRSV est composé de neuf ORFs. Deux ORFs (1a et 1b) codent pour les protéines non structurales ; l'élément de saut ribosomal (RFS) permettant la traduction de l'ORF1b est indiqué par un point noir. Sept ORFs (ORFs 2 à 7) codent pour les protéines de structure à partir d'un ensemble d'ARNm sous-génomiques. Ces ARNm (ARNm sous-génomiques 2 à 7) sont composés en 5' d'une séquence leader (boîte noire) et d'une séquence de régulation de la transcription ou TRS (boîte blanche). Figure adaptée de (Snijder et Meulenberg, 1998).

Les sept autres cadres de lecture, qui codent pour les protéines structurales, sont transcrits à partir d'un ensemble d'ARN sous-génomiques co-terminal en 3' (Meulenberg, 2000). Ces ARN sous-génomiques sont constitués d'une séquence leader dérivée de l'extrémité 5' et d'un corps qui ne sont pas contigus dans le génome. La séquence leader fusionne avec le corps par un mécanisme de transcription discontinue via une séquence conservée de régulation de la transcription (TRS). Le TRS est constitué de six nucléotides, UUAACC, qui précède l'ORF et qui est donc non transcrit (Yoo et al., 2004). Le mécanisme de transcription chez les PRRSV, comme pour les autres artérovirus, s'articule autour de deux modèles qui s'opposent dans leur approche mécanistique et qui sont résumés schématiquement sur la figure 1.4. Il est à noter que le modèle de l'extension discontinue du brin d'ARN- (Figure

1.4b) tend à supplanter le modèle de la transcription initié par la séquence leader (Figure 1.4a).



**Figure 1.4 : Mécanisme de transcription discontinue du PRRSV.**

a) Modèle de transcription initié par la séquence leader. L'ARN génomique positif est transcrit en un brin d'ARN négatif ou anti-génome. La polymérase virale initie ensuite la synthèse du brin + à l'extrémité 3' et produit ainsi la séquence leader et le TRS. L'ARN polymérase effectue ensuite un saut (saut du leader) au niveau d'une des copies de la séquence complémentaire au TRS dans l'anti-génome et réinitie la synthèse de l'ARNm sous-génomique. Bien que les ARNm sous-génomiques soient polycistroniques (hormis le plus petit), seule l'ORF en 5' terminal est traduit.

b) Modèle de transcription basé sur l'extension discontinue du brin d'ARN moins. Dans ce modèle, l'ARN polymérase initie la synthèse d'ARN négatif directement à partir de l'extrémité 3' de l'ARN génomique. Les ARN naissants ont une séquence complémentaire au TRS en 3' qui sert de signal à la polymérase pour effectuer un saut (saut du corps) au niveau de la séquence du TRS situé à l'extrémité 5' du génome. Ces ARN négatifs servent alors de matrice pour la transcription des ARNm sous-génomiques. Figure adaptée de (Pasternak et al., 2006).

La description des protéines portera essentiellement sur les souches nord-américaines.

#### 1.1.14 Protéines non structurales

L'ORF 1a est traduit directement à partir de l'ARN génomique et code pour une seule polyprotéine pp1a qui va être clivée au niveau de huit sites différents pour donner neuf protéines non structurales (nsp1 $\alpha$ , nsp1 $\beta$  et nsp2 à nsp8) (Meulenberg, 2000). Les nsp produites à partir de l'ORF 1a possèdent une activité protéolytique et sont responsables du clivage de la polyprotéine pp1ab ce qui va permettre la génération de quatre protéines non structurales additionnelles, les nsp9 à 12 (Figure 1.5).

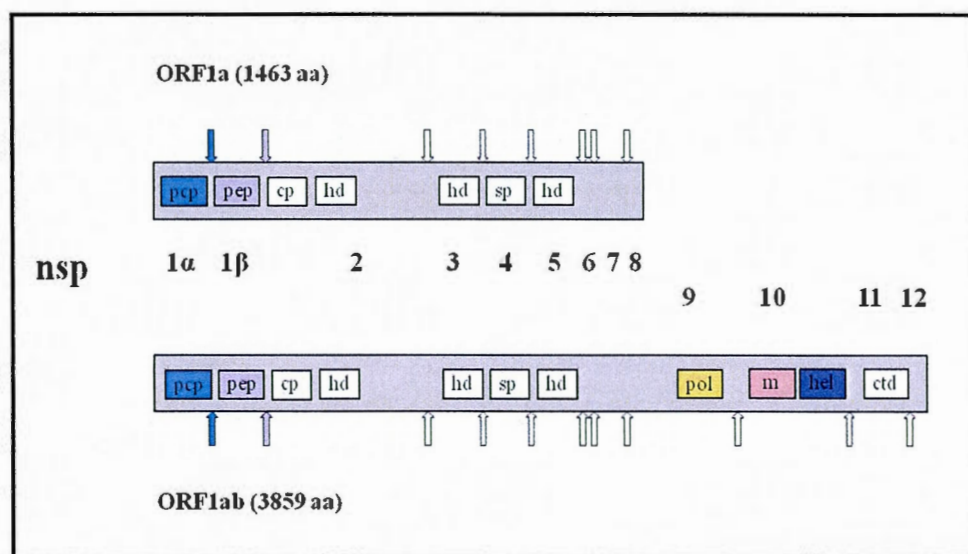
La nsp1 est une protéase à cystéine de la famille des papaines (PCP) qui permet le clivage entre les nsp1 et 2 grâce à deux domaines PCP : PCP $\alpha$  et PCP $\beta$ . Outre son activité protéase, la nsp1 joue un rôle déterminant dans la synthèse des ARN viraux génomiques et des ARNm sous-génomiques, ainsi que dans la régulation du passage de la transcription à la traduction (Kroese et al., 2008). Elle est présente au niveau du cytoplasme et du noyau (Song et al., 2010). La nsp2 est une protéase à cystéine (CP) qui clive à la jonction entre les nsp2 et 3. Il a été démontré que la nsp2 du PRRSV était présente sous différentes isoformes et qu'elle serait impliquée dans la réplication et la pathogenèse du virus (Han et al., 2010). La nsp4 a une activité sérine protéase (SP) et cible 9 sites de clivages au niveau des régions correspondant aux nsp3-12 (Tian et al., 2009).

La plupart des nsp sont localisées dans la région périnucléaire et y forment un complexe de réplication. Ce complexe semble ancré dans des structures probablement dérivées des membranes du réticulum endoplasmique, les vésicules à double membrane. Étant donné leur hydrophobicité, les nsp2, 3 et 5 sont des candidates probables pour l'ancrage du complexe aux membranes (Fang et Snijder, 2010).

Alors que les protéines codées par l'ORF1a sont nécessaires à la régulation de l'expression des gènes de la réplicase et à l'ancrage du complexe de réplication aux membranes, les protéines codées par l'ORF1b comprennent des domaines impliqués dans la réplication et la transcription et qui sont très conservés parmi les Nidovirus.



La nsp9 contient un domaine ARN polymérase ARN-dépendant (Meulenberg, 2000). La nsp10 comprend un motif ARN hélicase/nucléoside triphosphate ainsi qu'une région en doigt de zinc qui est impliquée dans la synthèse des ARNm sous-génomiques et la répllication du génome (Bautista et al., 2002). La nsp11 contient un domaine endoribonucléase spécifique aux résidus U (appelé NendoU pour nidoviral endonuclease specific for U), caractéristique des nidovirus et similaire à la nsp15 des Coronavirus (Nedialkova et al., 2009). La fonction de la nsp12 n'a pas encore été identifiée (Fang et Snijder, 2010).



**Figure 1.5 : Représentation schématique des polyprotéines codées par l'ORF 1a et 1ab.**

Les domaines de clivage des polyprotéines en 12 protéines non structurales (nsp) par des cystéines protéases de la famille des papaines (pcp), des cystéines protéases (cp) et des sérines protéases (sp) sont représentés. Les sites probables de clivage par les protéases sont indiqués par des flèches et sont basés sur une comparaison des séquences avec l'EAV. On peut noter la présence d'un domaine hydrophobe conservé (hd), d'un domaine ARN polymérase ARN dépendante (pol), d'un motif ARN hélicase/nucléoside triphosphatase (hel), d'un domaine de liaison aux métaux (m) et d'une séquence terminale conservée en 3' (ctd). Figure adaptée de (Meulenberg, 2000).

### 1.1.15 Protéines structurales

#### 1.1.15.1 Protéines structurales mineures

- **La glycoprotéine 2 (GP2)**

L'ORF 2 code pour la glycoprotéine GP2a qui est composé de 256 acides aminés et dont la taille est d'environ 29 à 30 kDa (Murtaugh et al., 1995). Elle contient deux sites potentiels de N-glycosylation qui ne sont pas essentiels pour l'infectiosité du virus (Wissink et al., 2004). C'est une protéine membranaire de classe I avec une séquence signal en N-terminal et une partie C-terminale transmembranaire. Elle contient deux domaines hydrophobes et elle est incorporée dans la partie extracellulaire des virions. La GP2a est essentielle à la réplication virale (Welch et al., 2004).

L'ORF 2 contient aussi un ORF interne 2b (E), qui code pour une petite protéine d'enveloppe non glycosylée, de 73 acides aminés et d'un poids moléculaire de 10 kDa (Wu et al., 2005). Cette protéine E fonctionnerait comme une viroporine enchâssée dans l'enveloppe virale. Elle faciliterait la liaison du virus à sa cellule cible et le relargage du génome dans le cytoplasme (Lee et Yoo, 2006).

- **La glycoprotéine 3 (GP3)**

L'ORF 3 code pour la glycoprotéine GP3 qui est composée de 254 acides aminés et dont la taille est d'environ 42 à 50 kDa. C'est la protéine la plus fortement glycosylée avec 7 sites de N-glycosylation (Jiang et al., 2007a). Elle possède un domaine fortement hydrophobe en N-terminal. Les 30 premiers acides aminés de la GP3 constitue une séquence signal qui va être éliminée lors de la maturation de la protéine. La GP3 est reconnue pour être une protéine de structure associée à la membrane sous forme d'hétérotrimère avec les protéines GP2a et GP4. Pour les souches européennes du PRRSV, la GP2b s'associerait également à cet hétérotrimère (Wissink et al., 2005). Cependant, il a été démontré que la GP3 de la souche nord-

américaine IFA-Klop était une protéine en partie sécrétée et non associée à la particule virale (Gonin et al., 1998; Mardassi et al., 1998).

- **La glycoprotéine 4 (GP4)**

La GP4 est une glycoprotéine structurale mineure de 178 acides aminés et d'environ 31 à 35 kDa. C'est une protéine membranaire de classe I qui possède quatre sites de N-glycosylation, ainsi que deux séquences très hydrophobes en N et C-terminal au niveau des acides aminés 162 à 178 (Lee et al., 2004). Elle possède également une séquence signal en N-terminal au niveau des acides aminés 1 à 22. La GP4 est essentielle à la réplication virale (Welch et al., 2004).

#### 1.1.15.2 Protéines structurales majeures

- **La glycoprotéine 5 (GP5)**

L'ORF 5 code pour une protéine de 200 acides aminés, avec un poids moléculaire de 24,5 à 26 kDa. La GP5 possède une séquence signal en N-terminal au niveau des acides aminés 1 à 25, puis un ectodomaine d'environ 35 acides aminés suivi d'une région hydrophobe avec deux domaines transmembranaires au niveau des résidus 65-130 et 170-190 ainsi qu'un domaine hydrophile en C-terminal d'environ 70 acides aminés (Dea et al., 2000). La protéine GP5 possède plusieurs sites de N-glycosylation (entre 2 et 5 selon les souches) au niveau de son ectodomaine (Dea et al., 2000). La glycosylation en position N44 est la seule à être indispensable pour l'infectiosité du virus (Ansari et al., 2006b). La protéine GP5 s'associe à la protéine membranaire M via des ponts disulfures (Mardassi et al., 1996) probablement via le résidu cystéine en position 9 de la protéine M (Ansari et al., 2006a). La liaison covalente entre la GP5 et la M semble être indispensable à l'assemblage des particules virales (Verheije et al., 2002).

En 2011, il a été démontré l'existence d'une protéine de structure, nommée GP5a, codé par un ORF alternatif compris dans l'ARNm sous-génomique codant pour la



GP5. La GP5a est une protéine de 43 à 64 acides aminés incorporée dans la particule virale. Les porcs infectés par le PRRSV développent des anticorps contre cette protéine mais son rôle reste à déterminer (Johnson et al., 2011).

- **La protéine de matrice (M)**

L'ORF 6 code pour la protéine M de 173 acides aminés. C'est une protéine de 18 à 19 kDa qui est non glycosylée avec trois domaines très hydrophobes dans la région N-terminale (Dea et al., 2000). La protéine M est une protéine membranaire de classe III avec un ectodomaine en N-terminal de 16 acides aminés suivi de 3 domaines transmembranaires et d'un endodomaine de 78 résidus en C-terminal (Mardassi et al., 1995; Wissink et al., 2005).

- **La protéine de nucléocapside (N)**

L'ORF 7 code pour la protéine de la nucléocapside N. La protéine N est une protéine d'environ 123 acides aminés avec un poids moléculaire de 14 à 15 kDa ; c'est une sérine phosphoprotéine basique non glycosylée. Très abondante, elle constitue environ 40 % des protéines totales du virion (Wootton et al., 2002). La protéine N est capable de former des homodimères par des liaisons covalentes ou non. Par liaison disulfure, la protéine forme des homodimères via la cystéine en position 23. Les liaisons non covalentes, qui ont lieu au niveau des résidus 30 à 37, contribuent à la polymérisation de la protéine N (Wootton et Yoo, 2003). Bien que le PRRSV se réplique au niveau du cytoplasme des cellules, une partie des protéines N se localisent au niveau du noyau et du nucléole. Cette localisation nucléaire serait impliquée dans la virulence du virus (Pei et al., 2008). Il a donc été suggéré que la protéine N pourrait jouer le rôle de protéine de structure au niveau du cytoplasme et le rôle de protéine non structurale au niveau du noyau/nucléole (Rowland et Yoo, 2003).

### 1.1.16 Variabilité du virus

Bien que les différentes souches du PRRSV provoquent la même maladie, les souches Nord-Américaines et Européennes présentent une grande variabilité génomique. En moyenne, les séquences des protéines structurales entre les souches Européennes et les souches Nord-Américaines divergent d'environ 40% (Tableau 1.2) (Murtaugh et al., 1998). Cette variabilité importante suggère qu'il pourrait s'agir de deux isolats viraux différents provenant d'un ancêtre commun (Nelsen et al., 1999).

**Tableau 1.2 : Pourcentages d'identité des protéines codées par l'ORF 2 à l'ORF 7 de la souche LV avec les autres souches de références (Dea et al., 2000)**

ORFs	Protéines	VR-2332 USA	IAF-Klop Canada	CH-1a Chine
2	GP2	63	59	58
3	GP3	60	54	56
4	GP4	70	68	68
5	GP5	55	52	54
6	M	79	81	80
7	N	64	59	60

La protéine M est la protéine la plus conservée (Meng et al., 1995) et la GP5 est la protéine qui diverge le plus avec seulement 52 à 55% de similarité entre les prototypes. La plupart des substitutions des acides aminés de la GP5 ont lieu au niveau de la région hypervariable adjacente à la séquence signal en N-terminal qui présente les sites de N-glycosylation, ce qui explique la différence de sites potentiels de N-glycosylation (Tableau 1.3). Avec un pourcentage de similarité de 54 à 60%, la GP3 est aussi une des protéines les moins conservée entre les deux continents. La protéine N est relativement bien conservée entre les deux génotypes majeurs (Dea et al., 2000).

**Tableau 1.3 : Comparaison entre les souches européennes et nord-américaines dans le nombre d'acides aminés et de sites de glycosylation des différentes protéines structurales du PRRSV (Dea et al., 2000)**

Protéines	Nombre d'acides aminés		Nombres de sites de glycosylation	
	Europe	Amérique du Nord	Europe	Amérique du Nord
<b>GP2</b>	249	265	2	2
<b>GP3</b>	265	254	7	7
<b>GP4</b>	183	178	4	4
<b>GP5</b>	201	200	2	2 à 5
<b>M</b>	173	174	0	0
<b>N</b>	128	123	0	0

#### 1.1.17 Réplication du virus

- **Tropisme cellulaire**

Le PRRSV se réplique dans les macrophages alvéolaires du poumon, les macrophages ou les cellules dendritiques des amygdales, des ganglions lymphatiques, du thymus, de la rate, des plaques de Peyer, du foie, des reins, des glandes surrénales et du cœur. Il se réplique de préférence dans les macrophages alvéolaires mais peut aussi se multiplier dans les monocytes circulants. On le retrouve également au niveau des cellules endothéliales du cœur, des cellules épithéliales de l'appareil respiratoire et des pneumocytes. Du matériel génétique viral a été retrouvé aussi au niveau de l'encéphale et de la moelle épinière, ainsi que dans les testicules, l'épididyme, la prostate et les glandes bulbo-urétrales (Albina, 1997b).

*In vitro*, le virus est capable de se répliquer dans les macrophages alvéolaires porcins et dans deux lignées issues des cellules MA-104 (cellules épithéliales embryonnaire de rein de singe vert d'Afrique) qui sont les cellules MARC-145 et les cellules CL-2621 (Suarez, 2000).

- **Entrée du virus dans la cellule**

Au niveau des macrophages alvéolaires, deux récepteurs ont été identifiés :

- ✓ Le premier type de récepteur est un récepteur héparane sulfate glycosamino-glycane qui est impliqué dans l'attachement du virus mais probablement pas dans l'internalisation du virus. La protéine M seule ou complexée avec la GP5 est probablement impliquée dans l'attachement à ce récepteur car cette protéine est capable de se lier à l'héparine qui est un analogue à l'héparane sulfate (Delputte et al., 2002).
- ✓ Le deuxième type de récepteur à la surface des macrophages alvéolaires porcins est un récepteur porcin à sialoadhésine (pSn). Ce récepteur est essentiel pour l'internalisation du virus par les macrophages (Vanderheijden et al., 2003). Certaines études suggèrent que la liaison du virus sur les récepteurs de type héparane sulfate glycosamino-glycane faciliterait la liaison du virus au récepteur de type sialoadhésine (Delputte et al., 2005).

Cependant ces deux types de récepteur permettent l'internalisation du virus mais ne permettent pas la décapsidation et la réplication virale. Il a été démontré que le récepteur scavenger CD163 avec le pSn était nécessaire pour internaliser le virus et permettre sa réplication dans les macrophages (Patton et al., 2009; Van Gorp et al., 2008). Les protéines GP2a et GP4 interagiraient avec le CD163 (Das et al., 2010) et seuls les complexes GP5/M sont capable de se lier aux pSn (Van Breedam et al., 2010).

Après l'attachement du virus au récepteur cellulaire, le virus pénètre par endocytose impliquant l'apparition de microfilaments cellulaires et la formation de vésicules à clathrine (voir figure 1.6). Après la fusion des vésicules à clathrine avec l'endosome, un pH acide est nécessaire pour permettre la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome. Des facteurs cellulaires spécifiques des cellules hôtes entrent aussi certainement en jeu pour permettre la fusion entre l'enveloppe



virale et l'endosome (Vanderheijden et al., 2003). Après dégradation de l'enveloppe virale, la nucléocapside virale est alors relarguée dans le cytoplasme (Suarez, 2000).

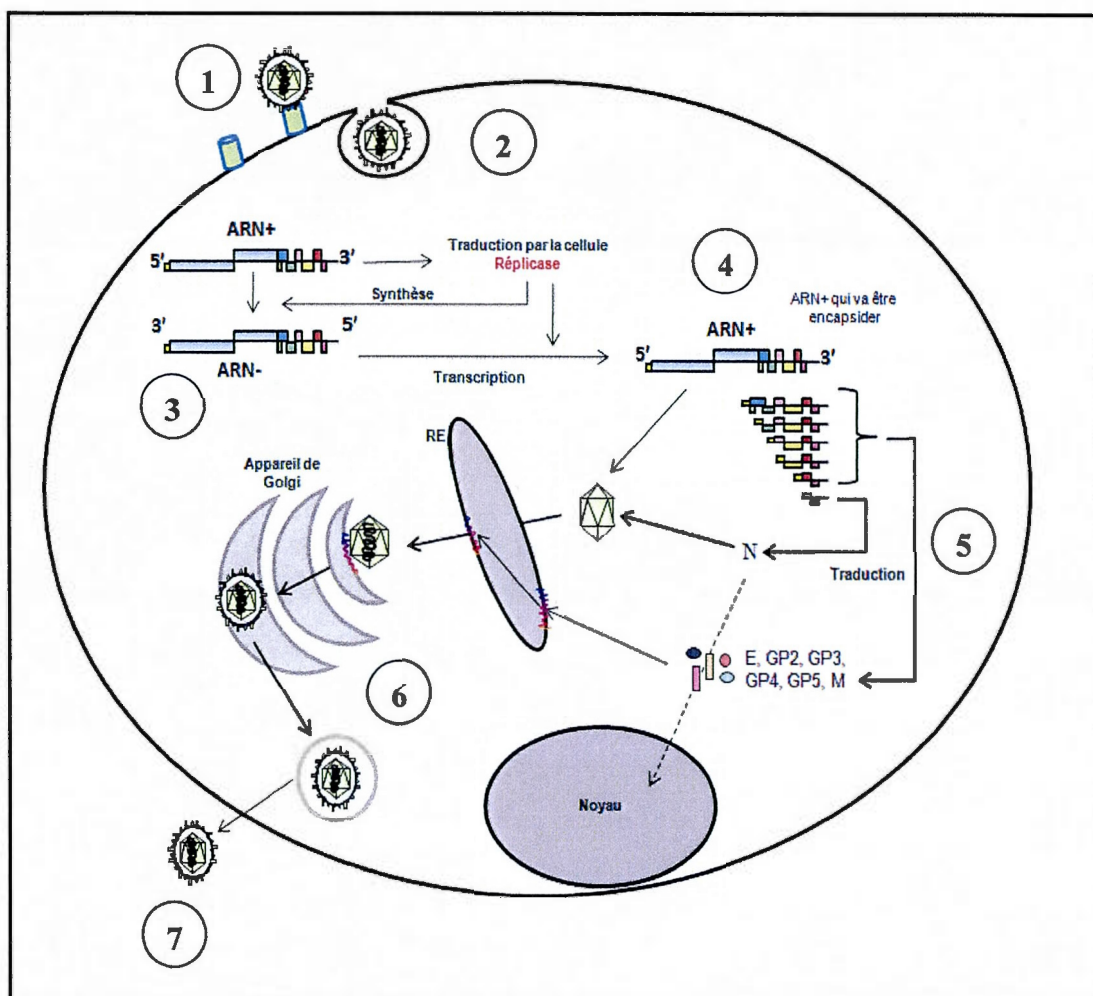
- **Réplication cytoplasmique**

Le virus se réplique au niveau du cytoplasme. Après décapsidation du matériel génétique, l'ARN simple brin positif est directement transcrit par la machinerie cellulaire. Seul l'ORF 1ab est traduit, produisant entre autre une ARN polymérase ARN dépendante. Cette dernière synthétise un brin d'ARN négatif complémentaire de l'ARN génomique. Ce brin d'ARN négatif permet ensuite la synthèse de sept brins positifs d'ARNm sous-génomiques. Tous ces ARNm ont une séquence 3' commune. Chaque ARNm est ensuite traduit en protéine, qui subit des modifications post-transcriptionnelles. Un ARN entier est aussi produit, mais non transcrit, pour servir de matériel génétique pour la génération suivante de virions.

La protéine M et GP5 semblent s'accumuler au niveau du réticulum endoplasmique qui à ce niveau se lie via des ponts disulfures. Ces protéines interagiraient ensuite avec la protéine N qui est accumulée au niveau du cytosol essentiellement au niveau de la région périnucléaire. Les vésicules contenant les nucléocapsides enveloppées seraient transportées vers le Golgi prémédian ou médian (Figure 1.6). Il est fort probable que certaines protéines GP5 terminent leur glycosylation au niveau de l'appareil de Golgi et que la protéine de matrice acquiert sa structure mature (Mardassi et al., 1996).

- **Bourgeonnement**

Le bourgeonnement des particules virales a lieu au niveau de l'appareil de Golgi. Le relarguage des particules virales se fait par exocytose ou par lyse des cellules (Suarez, 2000). Le cycle de réplication du virus dure environ 9 à 12 h et un effet cytopathique est visible après 24 h (Pol et al., 1997).



**Figure 1.6 : Représentation schématique du cycle de réplication du PRRSV.**

1. Attachement du PRRSV aux récepteurs cellulaires.
  2. Endocytose des particules virales.
  3. Synthèse du brin d'ARN négatif par la réplicase virale.
  4. Synthèse du brin d'ARN positif et des ARNm sous-génomiques.
  5. Traduction des ARNm sous-génomiques en protéines.
  6. Maturation des particules virales au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi.
  7. Relargage des particules virales par la cellule.
- Figure adaptée de (Snijder et Spaan, 2007).



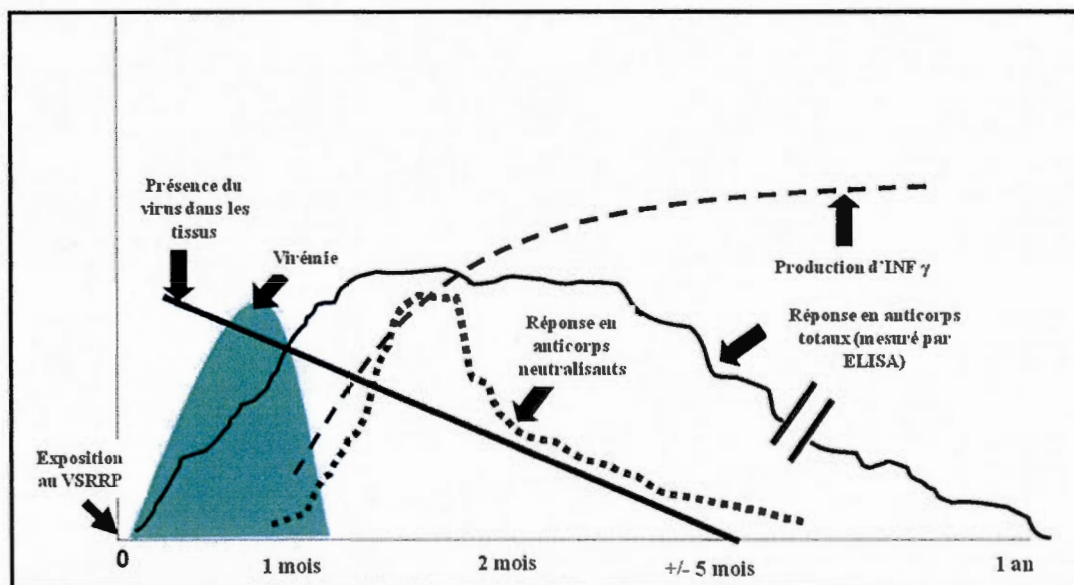
### 1.1.18 Caractéristiques physiques

Les densités du virus sur gradient de sucrose et de chlorure de césium sont respectivement de 1,14 à 1,3 g/ml et de 1,18 à 1,20 g/ml (Albina, 1997b). Le PRRSV peut survivre plusieurs mois à des températures de -70°C. Sa durée de vie diminue avec la température ; il résiste 20 jours à 4°C, 6 jours à 21°C, 24 h à 37°C et 20 min à 56°C (Benfield et al., 1992). La survie du virus à différentes températures est conditionnée par le pH environnant. À 37°C, la survie du virus est maximale à pH 6. Lorsque le pH est inférieur à 5,5 ou supérieur à 6,5, le temps de demi-vie est réduit d'un facteur de 2 (Bloemraad et al., 1994).

### 1.1.19 PRRSV et immunologie

#### 1.1.19.1 Réponse immunitaire humorale

Les porcs infectés par le PRRSV développent une réponse immunitaire humorale assez rapidement (Figure 1.7). En effet, la présence d'anticorps dans le sérum est détectable 1 à 2 semaines après l'infection, avec un pic 5 à 6 semaines post-infection (PI), et une persistance jusqu'à 42 semaines. Les IgM sont d'abord détectés au jour 7 PI, avec un pic 14 à 21 jours PI, puis le taux d'IgM baisse rapidement pour être indétectable aux jours 32 à 35. Les IgG apparaissent 11 à 14 jours PI, avec un pic entre les jours 21 et 28. Les IgG restent détectables pendant plusieurs mois PI (Loemba et al., 1996). Les IgG de classe 1 apparaissent 5 jours avant les IgG de classe 2 mais avec un niveau plus faible. Les IgA peuvent être détectés dans le sérum au jour 14 PI, avec un pic au jour 25 PI, ils ne sont plus détectables au jour 35 PI (Labarque et al., 2000). Les premiers anticorps sécrétés sont dirigés contre la nsp2 (de Lima et al., 2006), la nsp1, la protéine N (Johnson et al., 2007) puis contre la protéine M et enfin contre la GP5 (Mateu et Diaz, 2008).



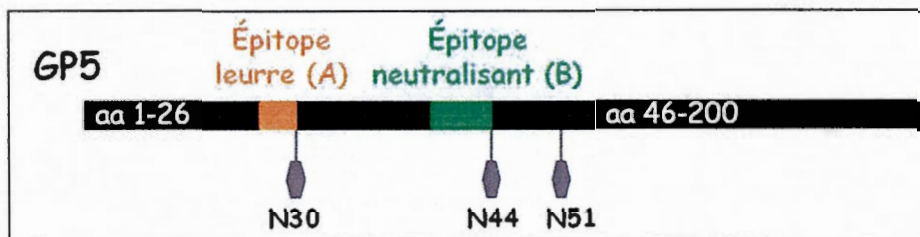
**Figure 1.7:** Séquence des principaux événements viraux et immunologiques lors d'une infection par le PRRSV.

Le diagramme suivant représente la cinétique de la réponse en anticorps totaux et neutralisants, ainsi que la production en INF- $\gamma$  et la présence du virus chez le porc après une infection par le PRRSV. Figure adaptée de (Lopez et Osorio, 2004).

Cependant, cette réponse précoce en anticorps ne permet pas une bonne protection contre l'infection par le PRRSV (Lopez et Osorio, 2004). La réponse précoce en anticorps non neutralisants semble plutôt avoir un effet positif sur le développement du PRRSV. En effet, il a été démontré que ces anticorps précoces non neutralisants augmentaient la réplication du virus dans les macrophages alvéolaires via l'attachement de complexe virus-anticorps au récepteur Fc des macrophages permissifs. Ce phénomène est connu sous le nom d'anticorps facilitant (ADE) (Tirado et Yoon, 2003). Les protéines ciblées par ces anticorps sont la GP5 et la N (Cancel-Tirado et al., 2004; Pirzadeh et Dea, 1998; Yoon et al., 1996). Cette réponse humorale en anticorps non neutralisants agirait comme un « Cheval de Troie » pour le PRRSV en facilitant sa liaison et son internalisation par les macrophages.

Les anticorps neutralisants contre le PRRSV n'apparaissent que 4 à 6 semaines après l'infection (Figure 1.7), avec un taux maximal 10 à 12 semaines PI (Albina et al., 1998b; Meier et al., 2003). Ces anticorps sont principalement dirigés contre la GP5 qui contient un épitope neutralisant majeur (Ostrowski et al., 2002; Pirzadeh et Dea, 1997). Les protéines GP3, GP4 et M contiennent aussi des épitopes neutralisants (Cancel-Tirado et al., 2004; Meulenberg et al., 1997; Yang et al., 2000). Cependant ces protéines semblent avoir un rôle biologique mineur par rapport à la GP5.

L'épitope majeur neutralisant de la GP5, nommé épitope B a été localisé au niveau des acides aminés 37-45. Une région immunodominante dans l'ectodomaine de la GP5 a également été déterminée. Il s'agit de l'épitope A qui induit une forte réponse en anticorps non neutralisants rapidement après l'infection (Ostrowski et al., 2002). Le corps de l'épitope A (entre les acides aminés 27 et 31) est situé sept acides aminés en amont de l'épitope B (Figure 1.8). Cet épitope joue le rôle d'épitope leurre et interfère donc avec la réponse immunitaire de l'épitope B, ce qui résulte en un délai de la réponse en anticorps neutralisants. Il a été démontré que l'insertion d'un épitope pan-DR helper T cell (PADRE) entre l'épitope A et l'épitope B permettait d'augmenter l'immunogénicité de l'épitope B, suggérant que la distance entre l'épitope A et B permettait une meilleure reconnaissance de l'épitope neutralisant (Fang et al., 2006). L'épitope leurre n'est pas la seule façon au PRRSV d'échapper à la réponse immunitaire humorale. En effet, la GP5 contient plusieurs sites de N-glycosylation localisés au niveau ou près de l'épitope neutralisant (N34/N44 et N51). La mutation des sites de glycosylation en N34 et N51 permet d'induire une réponse en anticorps neutralisants plus rapide et plus efficace. La mutation en N44 est quant à elle importante pour l'infectiosité du virus (Ansari et al., 2006b).



**Figure 1.8 : Représentation schématique de la GP5 du PRRSV.**

Représentation de la GP5 de la souche IAF-Klop du PRRSV, la position de l'épitope leurre et de l'épitope neutralisant ainsi que des différentes N-glycosylation sont indiquée sur le schéma.

L'apparition rapide d'un titre assez élevé en anticorps neutralisants semble être l'une des clefs pour permettre une bonne protection contre le PRRSV. Ces anticorps neutralisants sont capables de bloquer l'infection des macrophages par le virus (Delputte et al., 2004). De plus, un taux d'anticorps satisfaisants permettrait de protéger les truies gestantes contre les avortements prématurés et empêcherait une infection transplacentaire (Osorio et al., 2002). Cependant, la possibilité d'isoler le virus malgré la présence d'anticorps neutralisants indique que ces anticorps ne sont pas les seuls composants immunitaires impliqués dans l'élimination complète du virus. Le système immunitaire est toutefois capable d'éliminer le virus dans la majorité des cas et ceci en 150 jours ou moins après inoculation mais le mécanisme reste toujours inconnu (Allende et al., 2000).

#### 1.1.19.2 Réponse immunitaire à médiation cellulaire

La réponse cellulaire lors d'une infection par le PRRSV est très importante pour l'élimination du virus. La prolifération des lymphocytes T est détectable seulement 4 semaines après l'infection, avec un pic à 7 semaines et un déclin après 11 semaines (Bautista et Molitor, 1997). Cette prolifération concerne surtout des lymphocytes CD4<sup>+</sup> mais aussi des lymphocytes CD8<sup>+</sup>. En effet, une augmentation du nombre de lymphocytes CD8<sup>+</sup> est observée 3 à 5 semaines après l'infection (Albina et al.,



1998b). La prolifération de cellules T dirigées contre M, GP2 et GP5 est détectable entre 4 et 12 semaines PI, et la prolifération est plus importante lorsque les lymphocytes sont stimulés avec la protéine de matrice M (Bautista et al., 1999).

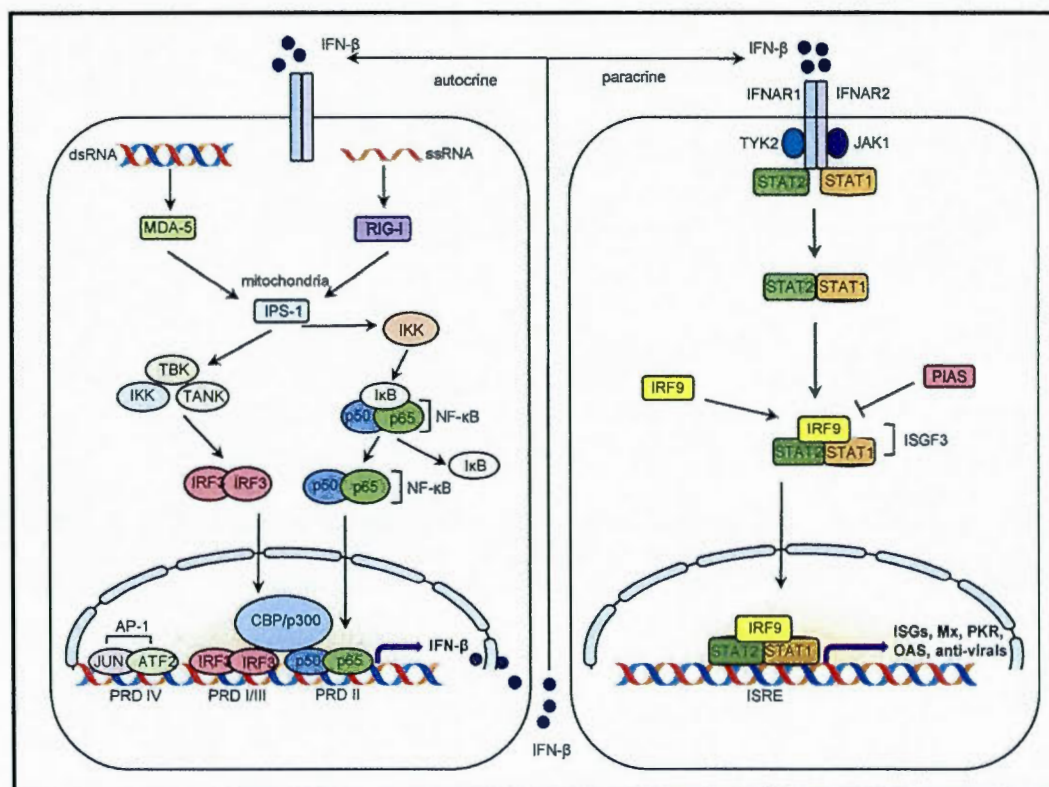
L'analyse de la réponse en interféron (INF)  $\gamma$  montre que les premières cellules sécrétant de l'INF- $\gamma$  apparaissent 3 semaines après l'infection avec 50 à 100 cellules par million de PBMC (cellules mononucléaires du sang périphérique) et ceci jusqu'à 13 semaines PI (voir figure 1.7). Puis il y a une augmentation à 400/500 cellules par millions de PBMC après l'infection. Les cellules sécrétant de l'INF- $\gamma$  sont en majorité des cellules CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, avec une faible proportion de cellules cytotoxiques CD4<sup>-</sup>/CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup>. La sécrétion d'INF- $\gamma$  est donc faible et longue à se mettre en place par rapport à d'autres virus porcins (Meier et al., 2003). Les protéines impliquées dans l'induction de la production d'INF- $\gamma$  serait les protéines M, N, GP4 et GP5 (Diaz et al., 2009; Jeong et al., 2010; Vashisht et al., 2008). Certaines études ont démontré que la présence d'INF- $\gamma$  corrèle avec un certain degré de protection des animaux (Diaz et al., 2006; Lowe et al., 2005; Martelli et al., 2009).

#### 1.1.19.3 Modulation du système immunitaire par le PRRSV

- **Interféron**

Lors d'une infection virale, la présence d'ARN permet d'activer de nombreuses fonctions antivirales comme la sécrétion d'INF de type I (INF- $\alpha$  et  $\beta$ ). Les mécanismes de production des INF de type I sont schématisés sur la figure 1.9. Cette sécrétion d'INF permet la synthèse de protéines telles que des protéines kinases ARN dépendante (PKR), des ribonucléases L et la 2',5' oligoadénylate synthase (OAS) qui ont pour effet de dégrader l'ARN et d'inhiber la synthèse des protéines.





**Figure 1.9 : Voie de signalisation de la production d'INF de type 1.**

Les récepteurs intracytoplasmiques RIG-1 (retinoic acid-inducible gene) et MDA5 (melanome differentiation-associated gene 5) sont capables de détecter la présence d'ARN intracellulaire. L'activation de ces récepteurs permet de stimuler soit la voie de l'IRF3 (Interferon response factor), soit la voie NF-κB via le facteur IPS-1 (interferon-beta promoter stimulator 1). L'IRF3, une fois activé, se dimérise et transloque au noyau où il forme un complexe avec les facteurs de transcription CBP/p300 qui se fixent sur le promoteur de l'INF-β et activent sa transcription. NF-κB quand à lui est séquestré au cytoplasme par le complexe IκB. L'activation des récepteurs va entraîner la phosphorylation de IκB ce qui va permettre son ubiquitination et sa dégradation au protéasome. NF-κB transloque alors au noyau et active la transcription de l'INF-β.

L'INF-β est ensuite synthétisé et sécrété puis il se fixe de façon autocrine sur les récepteurs à l'IFN (IFNAR1 et IFNAR2) de la cellule mais aussi sur les récepteurs des cellules voisines. La fixation de l'IFN sur son récepteur active la voie JAK/STAT. Les protéines STAT 1 et 2 vont alors former un complexe avec l'IRF9 qui s'appelle ISGF3 (interferon sensitive gene factor 3). Ce complexe sera alors transloqué au noyau où il peut activer l'ISRE (INF-stimulated regulatory response elements) et ainsi réguler la transcription des gènes de l'INFα/β. Il active aussi la transcription de nombreux autres gènes impliqués dans la réponse anti-virale (Yoo et al., 2010).

L'INF- $\alpha$  jouerait un rôle très important dans la pathogenèse du PRRSV car il a été démontré *in vitro* que l'INF- $\alpha$  était capable d'inhiber la réplication du PRRSV dans des macrophages alvéolaires porcins (PAMs) (Albina et al., 1998a). Cependant, il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que le taux d'INF de type 1 retrouvé lors d'une infection par le PRRSV était très faible, voire indétectable (Albina et al., 1998a; Overend et al., 2007; Van Reeth et al., 1999).

La nsp1 serait capable de moduler *in vitro* la réponse en INF de type 1 (Beura et al., 2010; Kim et al., 2010). Il a été démontré que la nsp1 agirait en dégradant la protéine CBP (CREB binding protein) au niveau du noyau, ce qui bloquerait l'activation de l'IRF3 et donc inhiberait la synthèse d'INF- $\beta$  (Kim et al., 2010). La nsp1 $\alpha$  serait capable d'inhiber la phosphorylation d'I $\kappa$ B et donc empêcherait la translocation de NF- $\kappa$ B au noyau dans la voie de signalisation du récepteur intracytoplasmique RIG-I. Ceci aboutit aussi en une inhibition de la synthèse d'INF- $\beta$  (Song et al., 2010). Il a donc été suggéré que la nsp1 $\alpha$  cytoplasmique inactiverait NF- $\kappa$ B et que la nsp1 $\alpha$  nucléaire serait responsable de la dégradation de CBP aboutissant ainsi à l'inhibition de la synthèse d'INF- $\beta$  (Yoo et al., 2010). Il a été aussi démontré que la nsp1 pouvait interférer dans la voie de signalisation des INF de type I en bloquant la translocation au noyau de l'ISGF3 (interferon stimulating gene factor) dans la voie de signalisation JAK/STAT induite par l'INF- $\beta$  (Chen et al., 2010b; Patel et al., 2010).

La nsp2 serait également capable d'interférer avec la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B en empêchant la poly-ubiquitination du facteur I $\kappa$ B via son domaine CP qui est une protéase à domaine OTU (ovarian-tumor) appartenant à la superfamille des déubiquitinases. Comme le facteur I $\kappa$ B ne peut pas être dégradé alors le facteur NF- $\kappa$ B ne peut pas être transloqué au noyau et induire la synthèse d'INF- $\beta$  (Sun et al., 2010). La nsp11 interférerait avec la sécrétion d'INF de type I. Elle serait capable d'inhiber la phosphorylation de l'IRF3 et donc d'empêcher sa translocation au noyau (Yoo et al., 2010). L'activité NendoU de la nsp11 serait impliquée dans sa capacité à inhiber l'INF- $\beta$  (Shi et al., 2011).

Cette induction faible en INF de type I permet donc au virus de se répliquer plus facilement et a pour conséquence un délai dans la production d'INF- $\gamma$ , dans la réponse à médiation cellulaire et dans la sécrétion d'anticorps neutralisants (Royace et al., 2004).

### • Cytokines

Les cytokines jouent un rôle important dans l'induction et la modulation des processus immunologiques. Lors d'une infection par le PRRSV, plusieurs études ont rapporté une augmentation du taux d'interleukine 10 (IL-10) au niveau des sécrétions broncho-alvéolaires, des PBMC (Suradhat et Thanawongnuwech, 2003; Suradhat et al., 2003), des PAM (Flores-Mendoza et al., 2008; Genini et al., 2008) et des cellules dendritiques (DCs) (Chang et al., 2008). La protéine N jouerait un rôle important dans la sécrétion de l'IL-10 mais son mécanisme n'a pas encore été identifié (Thanawongnuwech et Suradhat, 2010). Cependant, certaines études n'ont pas observé cette augmentation de l'IL-10 après infection (Thanawongnuwech et al., 2001; Wang et al., 2007b). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la sécrétion d'IL-10 dépendrait de l'isolat viral utilisé (Darwich et al., 2011; Diaz et al., 2006; Gimeno et al., 2011). L'IL-10 est connue pour inhiber de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, ce qui permettrait au virus d'échapper au système immunitaire. Cependant il a été démontré que l'infection par le PRRSV stimulait la production d'IL pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et d'IL-8 (Aasted et al., 2002; Labarque et al., 2003; Liu et al., 2009; Peng et al., 2009) mais ceci en moins grande quantité par rapport aux taux que l'on peut retrouver lors d'infection par d'autres virus porcins comme les coronavirus (Royace et al., 2004; Van Reeth et al., 2002). La production de TNF- $\alpha$  serait dans certains cas induites (Choi et al., 2002; Miguel et al., 2010). Sur la base des différentes études réalisées, la présence de cytokines pro-inflammatoires induite lors d'une infection au PRRSV serait fortement dépendante de la souche virale utilisée (Darwich et al., 2010).



- **Cellules dendritiques et présentation de l'antigène**

L'infection des cellules dendritiques par le PRRSV induit l'apoptose, la réduction de l'expression des marqueurs CD80/CD86, CD11b/c, le récepteur CD14 ainsi que l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). De plus, le virus induit dans ces cellules une augmentation de la sécrétion d'IL-10 ainsi qu'une diminution des cytokines de type Th1. Cette modulation des cellules dendritiques par le PRRSV aboutit donc à une mauvaise présentation de l'antigène aux cellules T (Flores-Mendoza et al., 2008; Loving et al., 2007; Wang et al., 2007b).

### **1.1.20 Vaccination expérimentale**

Étant donné l'importance économique du PRRSV dans l'industrie porcine et l'efficacité partielle des vaccins commerciaux disponibles, de nombreuses stratégies vaccinales ont été développées. Malheureusement aucune d'entre elles n'a permis jusqu'à aujourd'hui de conférer une protection optimale contre le PRRSV, mais elles ont cependant apporté des données supplémentaires pour le développement futur d'un vaccin efficace.

- Vaccins à base de virus recombinants

Une protection significative contre les signes cliniques, ainsi qu'une diminution des lésions ont été observées avec l'utilisation de virus de la pseudoréage recombinants exprimant la GP5 (Qiu et al., 2005). L'utilisation de ces virus recombinants exprimant les protéines GP5 (contenant la séquence PADRE) et M sous deux promoteurs différents a permis d'induire chez les porcs une bonne réponse en anticorps neutralisants, meilleure qu'un vaccin commercial inactivé, ainsi qu'une diminution des signes cliniques (Jiang et al., 2007c).

La souche Ankara modifiée du virus de la Vaccine a été utilisée pour exprimer les protéines GP5 et M en fusion ou sous différents promoteurs. La réponse immunitaire de la souris est légèrement meilleure lorsque les protéines sont exprimées sous le

contrôle de deux promoteurs différents mais l'efficacité n'a pas été testée chez le porc (Zheng et al., 2007). Le virus de la variole aviaire a été aussi utilisé comme vaccin vectoriel pour exprimer les protéines GP5/GP3 ainsi que l'IL-18 de porc permettant une protection partielle contre le PRRSV (Shen et al., 2007).

Des vaccins à base de coronavirus de la gastro-entérite transmissible (TGEV) exprimant les protéines M et GP5 mutée pour les glycosylations en N46 et N53 ont permis de générer une protection partielle (Cruz et al., 2010). En 2007, un système de baculovirus pseudotypé exprimant la protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse a été mis au point pour exprimer les protéines GP5 (contenant la séquence PADRE) et M en fusion. Ce système a permis d'induire une bonne réponse en anticorps neutralisants et en INF- $\gamma$  chez des souris, cependant l'efficacité de protection du système n'a pas été testée contre l'infection chez le porc (Wang et al., 2007a).

- Vaccins à base d'adénovirus recombinants

Les adénovirus recombinants non réplicatifs ont été utilisés dans de nombreuses études. Des adénovirus inductibles exprimant la protéine GP5 n'ont pas permis d'induire une réponse immunitaire bien qu'ils procurent toutefois une protection partielle contre l'infection (Gagnon et al., 2003). Cependant, l'utilisation de gènes optimisés pour le porc a permis d'obtenir une meilleure réponse (Kheyyar et al., 2005). Il a été démontré que l'utilisation d'adénovirus recombinants exprimant les protéines M et GP5 en fusion génère une meilleure réponse immunitaire chez les souris que l'utilisation d'adénovirus exprimant la GP5 ou la M seulement (Jiang et al., 2006a). L'immunisation de souris avec des adénovirus exprimant la GP3 tronquée pour les acides aminés 2-64 permet de générer une meilleure réponse immunitaire que la GP3 entière (Jiang et al., 2007a). Cette même équipe a aussi utilisé les adénovirus pour immuniser des souris avec la GP5 contenant différentes mutations pour les sites de glycosylation et a montré que la mutation des 4 sites de glycosylation (N30/N33/N44/N51) était celle qui permettait de générer la meilleure réponse en



anticorps neutralisants. Cependant leurs constructions n'ont pas été testées chez le porc (Jiang et al., 2007b). Des adénovirus exprimant les protéines GP3/GP5 en fusion avec la HSP70 (Li et al., 2009b) ou le GM-CSF (Wang et al., 2009b) ou le CD40L (Cao et al., 2010) ont tous permis de générer une protection partielle contre le PRRSV. Des adénovirus canins exprimant la protéine GP5 génèrent une moins bonne réponse immunitaire que l'utilisation d'un vaccin commercial inactivé (Zhou et al., 2010).

- Vaccins à ADN

L'utilisation de vaccin à ADN a été testée dans de nombreuses études. Ces différentes études ont démontré que l'utilisation de l'adjuvant C3d (produit de dégradation du facteur C3 du complément) en fusion avec la GP5 permet de générer une meilleure réponse immunitaire chez la souris (Zhang et al., 2011a) et l'utilisation d'un ligand GPGP entre les protéines GP5 et M permet de générer une meilleure protection partielle chez le porc (Chia et al., 2010). La vaccination de porcs avec un plasmide contenant une GP5 mutée pour les sites de glycosylation (N30, N34, N35 et N41) et contenant une séquence PADRE a permis de générer une meilleure réponse immunitaire qu'une GP5 wild type (WT), mais la capacité de protection n'a pas été évaluée (Li et al., 2009a). L'utilisation de la GP5 contenant une séquence PADRE en fusion avec la M a permis de générer une protection partielle chez le porc meilleure que l'utilisation d'un vaccin inactivé (Jiang et al., 2009). Des vaccins à ADN co-exprimant les protéines GP5 et M sous le contrôle de deux promoteurs différents permettent d'obtenir une bonne réponse en anticorps neutralisants chez les porcs testés, mais leur protection reste à déterminer (Jiang et al., 2006b). Des plasmides exprimant les protéines GP5 ou N en fusion avec l'IL-2 ou l'INF- $\gamma$  ont permis de réduire la réplication du virus dans les organes mais pas de l'inhiber complètement (Xue et al., 2004).

- Vaccins à base de vecteurs bactériens

La souche recombinante *Mycobacterium bovis* du BCG (Bacille de Calmette et Guérin) exprimant la protéine GP5 tronqué pour les 30 premiers acides aminés en fusion avec la protéine M a permis de générer une protection partielle chez le porc (Bastos et al., 2004). L'immunisation de souris par voie orale de *Salmonella typhimurium* exprimant la GP5 WT ou une GP5 mutée pour les acides aminés 2 à 25 permet de générer une faible réponse immunitaire, celle-ci étant meilleure avec la GP5 WT (Jiang et al., 2004). Cette bactérie a aussi été utilisée pour exprimer la protéine N, permettant de générer une réponse systémique et mucoale chez la souris (Han et al., 2011).

- Vaccins à base de plantes transgéniques

Des plantes transgéniques exprimant des protéines d'intérêt du PRRSV ont aussi été utilisées. Des extraits de pomme de terre exprimant la GP5 ont généré une faible réponse immunitaire chez la souris (Chen et Liu, 2011) ; par contre l'utilisation de feuille de tabac exprimant la GP5 en fusion ou non avec la LTB (sous-unité B de la toxine de *E. Coli*) permet de générer une protection partielle contre le PRRSV (Chia et al., 2011).

- Vaccins protéiques

Le système baculovirus a été utilisé pour produire les protéines GP3, GP5 et N. Bien qu'il a permis d'induire une bonne réponse en anticorps, il n'a pas permis d'induire une protection suffisante lors de l'infection avec le PRRSV (Plana Duran et al., 1997). Des porcs immunisés avec la protéine GP5 en mélange ou non avec un adjuvant n'ont pas permis de générer une protection contre le PRRSV (Pirzadeh et Dea, 1998; Prieto et al., 2011).

- Autres stratégies vaccinales

Certaines études ont consisté à améliorer l'efficacité de vaccins commerciaux déjà présents par l'utilisation d'adjuvant divers. Il a été ainsi démontré que l'IL-12 porcin (Charerntantanakul et al., 2006), des extraits de *Mycobacterium tuberculosis* (Dwivedi et al., 2011), de l'INF- $\alpha$  porcin (Royace et al., 2004) ou bien encore la toxine cholérique (Foss et al., 2002) permettaient d'augmenter l'efficacité du vaccin vivant atténué PRRSV MLV Ingelvac®. L'utilisation de CpG améliore l'efficacité de protection de vaccin inactivé (Linghua et al., 2007; Zhang et al., 2007).

Des vaccins chimériques ont aussi été développés, résultant de la recombinaison entre des souches très pathogéniques et des souches vaccinales (Ellingson et al., 2010; Wang et al., 2008). Ces derniers ne permettent pas non plus de générer une protection optimale.

## **1.2 Le Circovirus Porcin**

### **1.2.1 Historique**

Le circovirus porcin a été découvert pour la première fois en 1974 comme un contaminant d'une lignée cellulaire de rein de porc (PK-15) (Tischer et al., 1974). Mais c'est seulement en 1982 que ce contaminant a été identifié comme un virus à ADN simple brin, circulaire, d'où le nom de circovirus porcin (PCV) (Tischer et al., 1982). Bien que la présence d'anticorps dirigés contre le PCV fut ensuite mise en évidence chez les porcs, aucune pathologie n'a pu être attribuée à l'infection (Tischer et al., 1986). Cependant, en 1997, une pathologie appelée syndrome du dépérissement post-sevrage (SDPS) ou PMWS (Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome) fut associée au PCV (LeCann et al., 1997; Nayar et al., 1997). La caractérisation de cette nouvelle souche virale pathogénique a montré une différence génétique et antigénique avec les souches de PCV existantes auparavant (Hamel et al., 1998). Le nouveau

virus isolé fut alors appelé PCV de type 2 (PCV2) et le circovirus porcin isolé à partir des cellules PK-15 fut appelé PCV de type 1 (PCV1) (Meehan et al., 1998).

Selon la classification du comité international de taxonomie des virus (ICTV), les PCVs appartiennent à la famille des *Circoviridae*. Cette famille comprend deux genres : le genre *Gyrovirus* avec un unique représentant qui est le virus de l'anémie infectieuse du poulet (chicken anemia virus ; CAV) et le genre *Circovirus*. Le genre *Circovirus* est constitué à l'heure actuelle de 6 virus : le PCV1, le PCV2 et 4 autres virus qui affectent les oiseaux. Il s'agit du virus de la maladie du bec et du plumage des *Psittacidae* (beak and feather disease virus; BFDV), du circovirus du pigeon (pigeon circovirus; PiCV), du circovirus de l'oie (goose circovirus; GoCV) et du circovirus du canari (canary circovirus; CaCV). La revue de littérature suivante portera essentiellement sur le PCV2.

### **1.2.2 Hôte naturel et transmission**

Les PCVs ont une spécificité d'hôte pour le porc et le sanglier (Ellis et al., 2003). La transmission se fait principalement par voie oro-nasale par contact direct entre les animaux ou via les fèces et l'urine des animaux infectés (Segales et al., 2005a). La présence du PCV2 est détectable dans de nombreuses sécrétions et excréments des porcs (Ha et al., 2009; Segales et al., 2005b; Shibata et al., 2006; Shibata et al., 2003). La transmission verticale du PCV2 via le placenta serait assez rare (Park et al., 2005).

### **1.2.3 Variabilité génétique et phylogénie**

Les souches de PCV2 peuvent être divisées en deux génotypes principaux appelés PCV2a (ou génotype 1) et PCV2b (ou génotype 2). Les souches appartenant au génotype PCV2a ont une longueur de 1768 nt et ceux du PCV2b de 1767 nt (Olvera et al., 2007). Une protection croisée entre les génotypes PCV2a et PCV2b a été démontrée (Opriessnig et al., 2008). Il existe trois autres génotypes de PCV2 qui ont



été mis en évidence récemment. Il s'agit du PCV2c découvert au Danemark en 2008 (Dupont et al., 2008) et des PCV2d et PCV2e découverts en Chine en 2009 (Wang et al., 2009a). Des souches recombinantes entre les génotypes PCV2a et PCV2b ont été rapportées dans plusieurs études (Gagnon et al., 2010; Hesse et al., 2008; Lefebvre et al., 2009). Le génotype PCV2b serait à l'heure actuelle dominant au Canada (Gagnon et al., 2007).

#### **1.2.4 Prévalence et impact économique**

Les PCVs sont présents dans les élevages à l'échelle mondiale (Ramamoorthy et Meng, 2009). Les études actuelles montrent que la quasi-totalité des fermes seraient séropositives pour le PCV2, par contre la séoprévalence pour le SDPS seraient d'environ 4 à 30 % selon la taille et le type d'élevage (Segales et Domingo, 2002). Aux USA, avant l'utilisation des vaccins, les pertes estimées dues aux pathologies associées au PCV2 étaient de 3 à 4 dollars US par porc, ceci pouvant aller jusqu'à 20 dollars par porc (Gillespie et al., 2009).

#### **1.2.5 Pathologie**

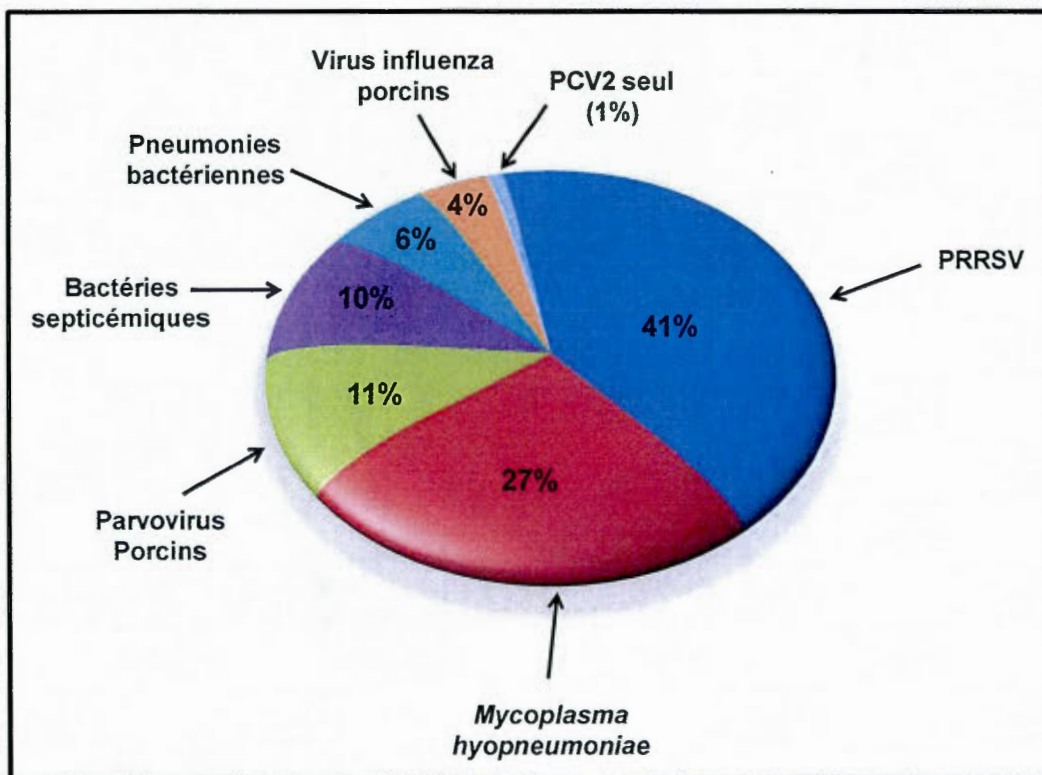
Les signes cliniques d'une infection par le PCV2 peuvent se manifester sous la forme d'une ou plusieurs pathologies. Depuis 2006, l'association américaine des vétérinaires porcins (AASV) a donc rassemblé les pathologies associées au PCV2 sous l'acronyme PCVAD (pathologies associées au circovirus porcin de type 2) (Gillespie et al., 2009). Les différentes pathologies associées sont :

- Le SDPS qui est la principale manifestation clinique. Le SDPS se déclare chez les porcs âgés de 2 à 4 mois. Il se caractérise principalement par un dépérissement, de l'anorexie, un état léthargique, de la fièvre, de la diarrhée, une coloration très pâle ou jaune (jaunisse) de la peau, une lympho-adénopathie et de la dyspnée (Allan et al., 1998; Chae, 2005; LeCann et al., 1997).

- Des entérites se caractérisant par de la diarrhée, un retard de croissance, une augmentation de la mortalité (Gillespie et al., 2009; Yang et al., 2003).
- Des problèmes respiratoires comme la pneumonie, impliquant un retard dans la croissance, de la fièvre, de la toux, de la dyspnée, de l'anorexie (Gillespie et al., 2009). Des cas d'infection au PCV2 ont été associés au complexe respiratoire porcin (Kim et al., 2003).
- Le syndrome de dermite-néphropathie (SDN) qui se déclare principalement chez les porcs à l'engraissement. Ce syndrome se caractérise par des lésions nécrosantes de la peau surtout dans la région postérieure et par de graves lésions au niveau des reins. Les porcs affectés meurent assez rapidement (Opriessnig et al., 2007; Rosell et al., 2000).
- Des troubles de la reproduction, se manifestant par des mise-bas prématurées, des avortements tardifs, la présence de porcelets morts nés et des cas de momifications fœtales. Cependant, les troubles de la reproduction dus au PCV2 dans les élevages seraient assez rares (Opriessnig et al., 2007).

### **1.2.6 Facteurs contribuant au développement des PCVAD**

Les infections par le PCV2 ont une forte prévalence, cependant les animaux ne développent des signes cliniques des PCVAD que dans certaines conditions. En effet, seulement 1% des cas pathologiques seraient dus à une infection unique par le PCV2 (Magar et al., 2000; Ramamoorthy et Meng, 2009). Plusieurs cofacteurs contribuant au développement des PCVAD ont été identifiés notamment l'interaction fréquente du PCV2 avec d'autres pathogènes. Ces principaux pathogènes sont représentés sur la figure 1.10 (Ramamoorthy et Meng, 2009).



**Figure 1.10:** Représentation graphique des pathogènes interagissant avec le PCV2 lors de cas de PCVAD.

Figure adaptée de (Ramamoorthy et Meng, 2009).

D'autres cofacteurs non infectieux ont été identifiés :

- Le statut immunologique des truies : la présence d'une immunité colostrale chez les porcelets a été démontrée comme protectrice, et ceci de façon dose dépendante (Calsamiglia et al., 2007; McKeown et al., 2005).
- La race des animaux : les porcs de race Landrace seraient plus susceptibles à développer des PCVAD que les porcs de races Duroc, Piétrain et Large White (Opriessnig et al., 2006a; Opriessnig et al., 2009).
- L'âge des animaux : le SDPS toucherait plus particulièrement les animaux en post-sevrage ou en début d'engraissement (Harding, 2004; Segales et Domingo, 2002).

- L'immunostimulation : plusieurs études ont démontré que la vaccination des animaux contre d'autres agents pathogènes (Opriessnig et al., 2003) ou l'utilisation de certains adjuvants pouvaient déclencher l'apparition des PCVAD (Allan et al., 2000b; Krakowka et al., 2001).
- L'absence de bonnes pratiques d'élevage (Lopez-Soria et al., 2005; Rose et al., 2003; Woodbine et al., 2007).

### 1.2.7 Contrôle de l'infection

À l'heure actuelle 4 vaccins commerciaux sont disponibles (Tableau 1.4). La compagnie Boehringer Ingelheim propose aussi de vacciner les animaux simultanément pour le PCV2 et *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* (Ingelvac® CircoFLEX-MycoFLEX™) mais aussi pour le PCV2, *M. hyopneumoniae* et le PRRSV (3FLEX™). Ces vaccins consistent à vacciner en une seule fois les animaux avec un mélange des vaccins commerciaux propre à chaque pathogène. L'efficacité de ces vaccins a été démontrée en conditions expérimentales et de champ. Ils permettent de faire diminuer significativement les taux de mortalité (environ 50%) dus au SDPS (Fachinger et al., 2008; Horlen et al., 2008; Segales et al., 2009).

**Tableau 1.4 : Liste des vaccins commerciaux disponibles pour lutter contre le PCV2**

Nom du vaccin	Compagnie	Antigène
Ingelvac CircoFLEX®	Boehringer Ingelheim	Protéine Cap du PCV2
CIRCOVAC®	Merial	PCV2 inactivé
Suvaxyn® PCV2 one dose	Fort Dodge Pfizer	Virus PCV1-2 chimérique inactivé
Porcilis® PCV	Intervet-Schering	Protéine Cap du PCV2



Hormis les vaccins commerciaux, différents vaccins à base de vecteurs viraux ou d'ADN ont été testés. Ils expriment principalement la protéine de capsid (Cap) car elle a été longtemps considérée comme la protéine la plus immunogénique (Blanchard et al., 2003). Cependant des études récentes démontrent que la protéine initiateur de la réplication (Rep) serait aussi immunogénique que la protéine Cap (Fort et al., 2010; Perez-Martin et al., 2008). Parmi ces différents vaccins, on peut citer l'utilisation :

- du virus de la pseudo-rage recombinant exprimant les protéines Rep et Cap en fusion (Ju et al., 2005) ou la protéine Cap seule (Song et al., 2007).
- d'adénovirus recombinant exprimant la protéine Cap (Wang et al., 2007c; Wang et al., 2006) ou la protéine Cap en fusion avec la protéine GP5 du PRRSV (Wang et al., 2009c)
- de pseudo-particules virales (VLP, virus-like particules) formées de la protéine Cap exprimée chez la levure (Bucarey et al., 2009), chez les baculovirus (Liu et al., 2008) et chez des cellules d'insectes (Fan et al., 2007).
- des vaccins ADN exprimant la protéine Cap (An et al., 2008; Kamstrup et al., 2004; Shen et al., 2008).

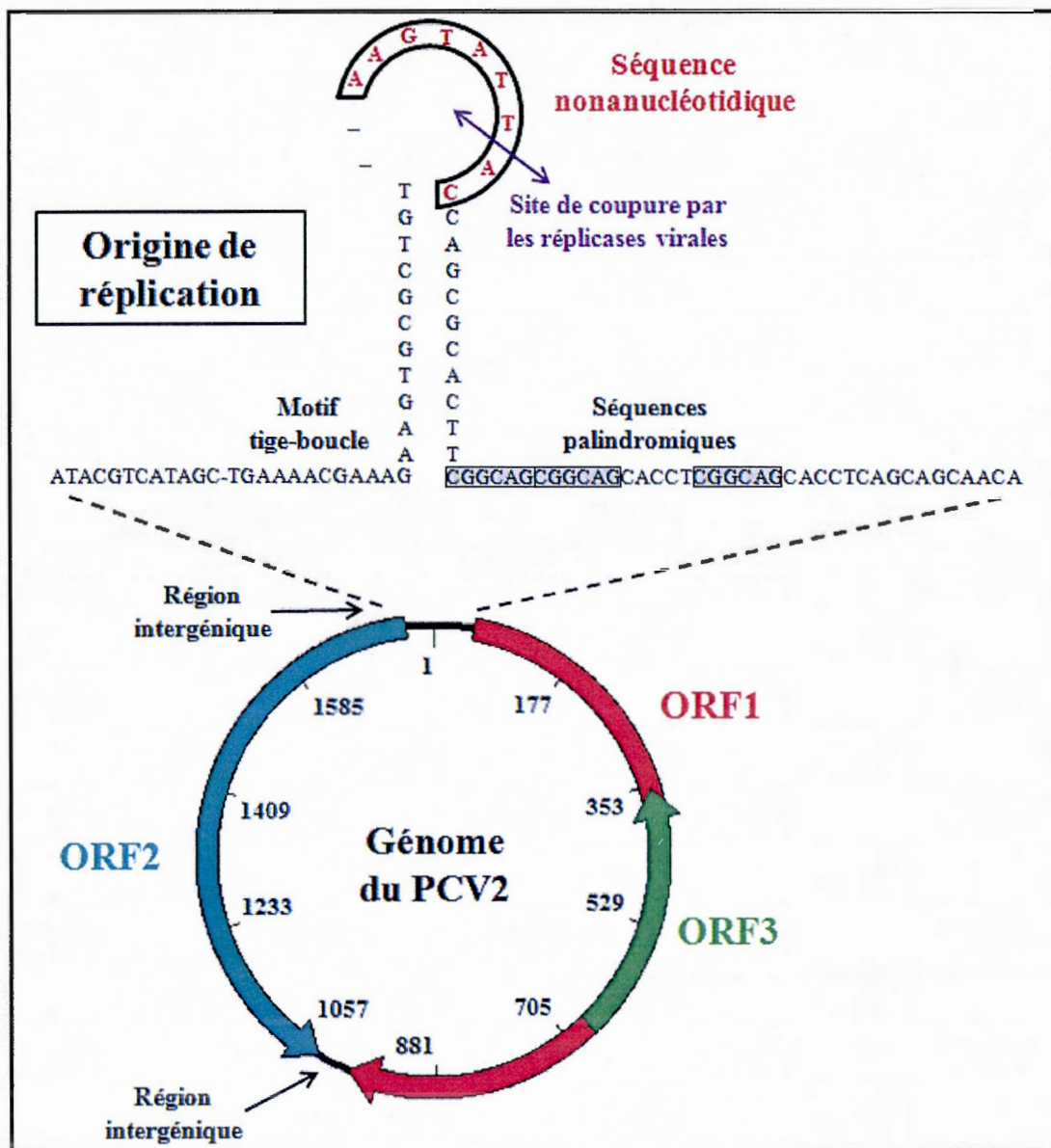
Hormis les vaccins ADN, ces différentes stratégies de vaccination ont permis d'induire une réponse immunitaire chez le porc avant infection expérimentale et une élimination virale. Les vaccins ADN ont permis d'obtenir des bons résultats chez la souris (An et al., 2008; Kamstrup et al., 2004; Shen et al., 2008), cependant chez les porcs, la réponse immunitaire est induite seulement après infection expérimentale et une augmentation de la réplication du PCV2 a été observée (Blanchard et al., 2003).

### **1.2.8 Organisation génomique**

Les PCVs font partie des plus petits virus connus à l'heure actuelle. Ils sont non enveloppés et possèdent une capsid à symétrie icosaédrique, leur diamètre étant d'environ 17 nm (Tischer et al., 1982). Leur génome est composé d'un ADN simple

brin circulaire de 1 759 nt pour le PCV1 et de 1 767-1 768 nt pour le PCV2 (Gillespie et al., 2009). Le PCV2 a un génome qui est composé de deux ORFs, d'orientation opposée, appelé ORF1 et ORF2 (Figure 1.11). Cet arrangement crée deux régions intergéniques; la région intergénique comprise entre les extrémités 5' comprend l'origine de réplication. Cette origine de réplication forme un motif tige-boucle qui est composé d'une séquence nonanucléotidique et de séquences palindromiques (Finsterbusch et Mankertz, 2009).

L'ORF1 est situé sur le brin viral de polarité positive et code pour deux protéines non structurales Rep (314 aa; 37 kDa) et Rep' (178 acides aminés; 20 Kda) (Mankertz et al., 2003). Ces deux protéines sont nécessaires à l'initiation de la réplication virale (Gillespie et al., 2009). L'ORF2, situé sur le brin viral de polarité négative, code pour l'unique protéine de structure qui est la capsid (Cap) (233 acides aminés; 28 kDa) (Nawagitgul et al., 2000). La présence d'une protéine non structurale codée par l'ORF3, dans une direction anti-sens de l'ORF1, a été rapportée récemment (Liu et al., 2005). Cette protéine de 105 acides aminés jouerait un rôle dans l'apoptose, la pathogénèse et la réplication virale (Karuppannan et al., 2009). Cependant, des travaux supplémentaires sont nécessaires afin de caractériser le rôle précis de cette protéine.



**Figure 1.11 : Représentation schématique du génome du PCV2.**

Le génome du PCV2 contient trois ORFs. L'origine de réplication se situe au niveau d'une des régions intergéniques et elle est constituée d'un motif en tige boucle. La séquence nonnucléotidique est essentielle à la réplication virale.

Figure adaptée de (Faurez et al., 2009; Finsterbusch et Mankertz, 2009).

### 1.2.9 Réplication

Les PCVs répliquent leur génome via un mécanisme de cercle roulant (RCR) en «melting-pot» (Cheung, 2004). Après infection des cellules, les ADN polymérases cellulaires permettent la formation d'un intermédiaire ADN double brin de structure hélicoïdale à partir de l'ADN viral simple brin. Un complexe de réplication comprenant les protéines rep et rep' se fixe ensuite sur la séquence nonanucléotidique de l'intermédiaire double brin (Steinfeldt et al., 2001). Cette séquence nonanucléotidique contient un motif conservé entre les PCVs (Hamel et al., 1998) et est essentielle à la réplication (Cheung, 2005). Les réplicases virales coupent alors la séquence nonanucléotidique (Figure 1.10) sur un seul brin d'ADN, ce qui engendre la formation de deux extrémités libres sur l'ADN viral. Cet environnement d'instabilité, où les brins + et - sont proches mais non liés, est connu sous le nom de «melting-pot». L'extrémité 3'OH libre devient alors le point de départ pour la réplication de l'ADN viral par les ADN polymérases cellulaires (Cheung, 2004; Steinfeldt et al., 2006). Les séquences palindromiques situées au niveau de la structure tige-boucle joueraient un rôle important dans la terminaison de la réplication (Cheung, 2004).

### 1.2.10 PCV2 et réponse immunitaire

L'étude de la réponse immunitaire induite par le PCV2 est assez complexe étant donné l'aspect multifactoriel entraînant le passage d'une infection sous-clinique à une déclaration des PCVAD.

#### 1.2.10.1 Réponse humorale

En condition expérimentale, les porcs développent en moyenne une réponse en anticorps contre le PCV2 entre le jour 10 et 28 PI (Allan et al., 1999; Meerts et al., 2005; Patterson et al., 2011; Pogranichnyy et al., 2000). La présence d'anticorps neutralisants concorde avec l'apparition des anticorps totaux chez les porcs ayant une



infection sous-clinique (Meerts et al., 2006). Ces anticorps neutralisants jouent un rôle dans la diminution de la charge virale (Fort et al., 2007) et dans la pathogénèse (Meerts et al., 2006). En condition de champ, il est connu que les porcs, jusqu'à l'âge de 4 semaines, ne développent pas de PCVAD (Larochelle et al., 2003; Ostanello et al., 2005), suggérant que l'immunité maternelle est protectrice (McKeown et al., 2005). Il y aurait par la suite une disparition des anticorps maternels puis une nouvelle séroconversion chez les porcs âgés de 7 à 15 semaines. Les résultats actuels, aussi bien en conditions expérimentale que de champ, supportent le fait qu'une faible réponse immunitaire humorale, en particulier en anticorps neutralisants, pourrait jouer un rôle dans le développement du SDPS (Fort et al., 2007; Kekarainen et al., 2010).

#### 1.2.10.2 Réponse cellulaire

Le PCV2 a un effet immunosuppresseur (Segales et al., 2004). En effet, chez les porcs atteints de SDPS, on peut noter une diminution du nombre de cellules dendritiques inter-folliculaires, de cellules interdigitées, de cellules B, de cellules T et de cellules NK (Darwich et al., 2002; Nielsen et al., 2003; Sarli et al., 2001; Segales et al., 2001). Par contre on peut observer une augmentation du nombre de monocytes et de granulocytes (Segales et al., 2001). Le PCV2 infecterait particulièrement les DCs et les macrophages, mais il ne se répliquerait pas de façon optimale, suggérant donc un rôle important de ces cellules dans la persistance virale (Vincent et al., 2003). La présence du PCV2 dans les DCs n'interfère pas avec leur capacité à interagir avec les lymphocytes (Vincent et al., 2005) mais il interférerait avec l'activité microbicide des macrophages (Chang et al., 2006).

### 1.2.10.3 Modulation de la réponse cytokinique

Les porcs déclarant un SDPS ont un changement dans la réponse cytokinique. Des études ont montré une augmentation importante du taux d'IL-10 (Darwich et al., 2003; Sipos et al., 2004), suggérant une association entre le taux plasmatique d'IL-10 et le développement d'un SDPS (Hasslung et al., 2005; Stevenson et al., 2006). Cette augmentation d'IL-10 résulterait en une diminution de la réponse immunitaire de type Th1 étant donné que l'IL-10 va réguler négativement l'expression de cytokines nécessaires à la présentation antigénique (Kekarainen et al., 2008). Il y aurait aussi une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-8 et une diminution des taux d'IL-2, d'IL-4 et d'IL-12p40 (Darwich et al., 2003).

## 1.3. *Mycoplasma hyopneumoniae*

### 1.3.1 Généralités sur les mycoplasmes

D'après le comité international de la systématique des procaryotes, les mycoplasmes appartiennent au phylum des Ténéricutes, à la classe des *Mollicutes*, à l'ordre des *Mycoplasmatales*, à la famille des *Mycoplasmataceae* et au genre *Mycoplasma* qui contient lui-même plus de 110 espèces (Minion et al., 2004). Ces espèces sont des pathogènes retrouvés chez l'homme, les mammifères, les poissons, les arthropodes, les reptiles ou les plantes (Razin et al., 1998). Chez le porc on retrouve 7 espèces de mycoplasmes : *hyorhinis*, *hyosynoviae*, *flocculare*, *hyopharyngis*, *sualvi*, *suis* et *hyopneumoniae*. Parmi ces différentes espèces, c'est *M. hyopneumoniae* qui est responsable des pertes économiques les plus importantes pour les producteurs de porcs (Kobisch et Marois, 2008).

Les mycoplasmes se caractérisent par le fait qu'ils sont dépourvus de paroi cellulaire et qu'ils possèdent un génome de petite taille (580 à 1350 kb) contenant une faible proportion de G+C (23 à 40%). De plus, ils utilisent le codon stop UGA pour coder un résidu tryptophane (Sirand-Pugnet et al., 2007). Ils se caractérisent

également par leur faible capacité de biosynthèse des acides aminés. Ils sont donc dépendants de leur parasitisme afin de pourvoir à leurs besoins nutritionnels et sont difficiles à cultiver en laboratoire (Razin et al., 1998).

### 1.3.2 Historique et impact économique

*M. hyopneumoniae* a été mis en évidence pour la première fois en 1965 aux États-Unis (Mare et Switzer, 1965) et au Royaume-Uni (Goodwin et al., 1965) puis en 1975 en France (Kobisch et Tillon, 1976). C'est l'agent de la pneumonie enzootique du porc (PEP) qui est une maladie chronique du système respiratoire. La PEP a une distribution mondiale et elle engendre des pertes économiques très importantes dans les élevages porcins. Ces pertes ont été estimées en 2002 à 1 milliard de dollars par an pour l'ensemble de la filière porcine mondiale (Minion, 2002). Il n'existe cependant pas de données récentes sur l'impact économique de la PEP.

### 1.3.3 Transmission

*M. hyopneumoniae* infecte les porcs de tout âge et les sangliers (Sibila et al., 2010). La transmission du pathogène se fait principalement par contact direct entre les animaux (Marois et al., 2007). Ceci arrive généralement lors de l'introduction dans l'élevage d'un animal infecté mais asymptomatique (Sibila et al., 2009). La transmission peut se faire via les aérosols générés par la toux et les éternuements des animaux infectés (Sibila et al., 2009; Stark, 1999). Une transmission verticale de la truie aux porcelets a également été mise en évidence, cependant cette transmission ne se fait pas lors du développement des fœtus mais par voie respiratoire après la naissance des porcelets (Sibila et al., 2009). Il a été démontré que la transmission du pathogène pouvait se faire d'une exploitation agricole à une autre sur une distance supérieure à 9 km (Dee et al., 2009; Otake et al., 2010).

### 1.3.4 Signes cliniques et lésions

*M. hyopneumoniae* est l'agent primaire de la PEP. Des facteurs environnementaux, ainsi que d'autres pathogènes peuvent intervenir dans le développement de la PEP (Morris et al., 1995). La PEP se caractérise par un faible taux de mortalité et un fort taux de morbidité, pouvant aller jusqu'à 100% dans certains élevages (Kobisch et Marois, 2008). Une infection unique à *M. hyopneumoniae* va générer de faibles signes cliniques qui vont durer environ 2 mois (Kobisch et al., 1993). Les signes cliniques varient selon l'âge des porcs (Morris et al., 1995; Noyes et al., 1990) et la virulence de la souche de mycoplasmes (Vicca et al., 2003). Les principaux signes cliniques sont une toux sèche et chronique, une légère hyperthermie (entre 40 et 40,5°C), une diminution de la prise de poids et de la dyspnée (Kobisch et Marois, 2008). La toux apparaît généralement 10 à 16 jours après une infection expérimentale (Maes et al., 2008). Les symptômes peuvent persister pendant 8 à 12 semaines puis disparaissent progressivement (Kobisch et Marois, 2008). L'infection à *M. hyopneumoniae* peut persister dans le tractus respiratoire des animaux plus de 200 jours (Fano et al., 2005; Pieters et al., 2009).

Suite à l'infection, lors de la phase aigue, il apparaît des lésions microscopiques qui se caractérisent par une infiltration de cellules mononuclées au niveau des zones périvasculaires et péribronchiolaires (Kobisch et Friis, 1996). Lors de la progression de la maladie, on peut observer des lésions macroscopiques typiques de la PEP au niveau des poumons qui se caractérisent par des zones de consolidation de couleur gris mauve des lobes apicaux, cardiaques et diaphragmatiques (Maes et al., 2008). L'infection due à *M. hyopneumoniae* est beaucoup plus problématique dans le cas d'infections secondaires par un autre pathogène notamment *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, le virus influenza porcin, le PRRSV et le PCV2 (Redondo et al., 2009).



### 1.3.5 Contrôle de l'infection

Le contrôle de l'infection à mycoplasme peut se faire via l'utilisation de bonnes pratiques d'élevages, d'antibiotiques ou de vaccins. Les antibiotiques peuvent s'utiliser en prévention ou bien en traitement de la maladie. Les tétracyclines et les macrolides, qui inhibent la synthèse des protéines, sont les plus efficaces (Maes et al., 2008). Bien que les antibiotiques puissent avoir un certain effet, la vaccination est considérée comme étant la meilleure alternative pour prévenir la PEP. Il existe différents vaccins commerciaux disponibles qui sont tous des préparations de bactérines en mélange avec divers adjuvants (Tableau 1.5).

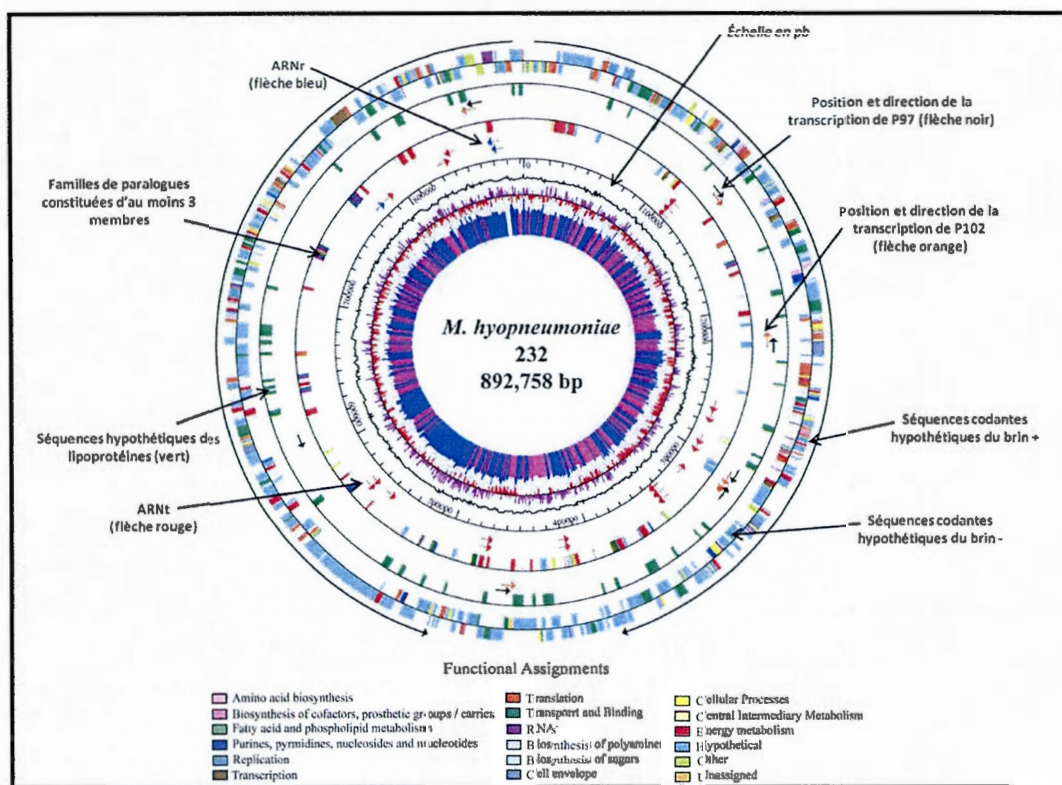
**Tableau 1.5 : Liste des vaccins commerciaux contre *M. hyopneumoniae***

Nom du vaccin	Compagnie	Adjuvant
HYORESP®	Meriel	Hydroxide d'aluminium
RespiSure-ONE®	Pfizer	Amphigen® : Adjuvant huile (lécithine) dans l'eau
Ingelvac® MycoFLEX™	Boehringer Ingelheim	ImpranFLEX® : solution aqueuse de polymères
Porcilis® M. HYO	Intervet	Diluvac Forte®: adjuvant eau dans l'huile
Suvaxyn® M. Hyo	Pfizer	Carbopol® : solution aqueuse de polymères
M+PAC®	Intervet	Emunade® : adjuvant eau dans l'huile

La vaccination contre la PEP est utilisée dans de nombreux pays et il a été estimé qu'environ 70% des élevages porcins avaient recours à celle-ci. La vaccination permet d'augmenter la prise de poids journalière des animaux, de réduire les signes cliniques et les lésions pulmonaires (Haesebrouck et al., 2004; Meyns et al., 2006). Cependant elle ne permet pas d'empêcher la colonisation du tractus respiratoire par le pathogène et donc sa transmission (Chae, 2011; Sibila et al., 2007). Les vaccins disponibles actuellement offrent donc seulement une protection partielle et ils ont de plus l'inconvénient de ne pas permettre de discriminer les animaux vaccinés de ceux infectés naturellement.

### 1.3.6 Organisation génomique

Le génome de *M. hyopneumoniae* est constitué d'un ADN double brin circulaire d'une taille d'environ 900 kb qui contient 28,6% de GC. L'analyse du génome de la souche 232 a permis de déterminer que son génome code potentiellement pour 692 protéines ce qui représenterait environ 91% de son génome (Minion et al., 2004). La figure 1.12 représente l'organisation génomique hypothétique de la souche 232.



**Figure 1.12 : Organisation génomique de la souche 232 de *M. hyopneumoniae*.**

Les flèches extérieures représentent les sens de réplication, le premier cercle représente les séquences potentiellement codantes situées sur le brin positif et le deuxième cercle celles situées sur le brin négatif. Le troisième cercle indique les séquences codantes pour les lipoprotéines. Les flèches situées au niveau du quatrième cercle représentent la position et la direction des séquences codantes pour la P97 ou ses paralogues (noir) et pour la P102 et ses paralogues (orange). Le cinquième cercle indique la position des familles de paralogues contenant au moins 3 membres. Les flèches du sixième cercle indiquent la position des séquences codantes pour les ARNr (bleu) et les ARNt (rouge). Source (Minion et al., 2004).

### 1.3.7 Pathogenèse

*M. hyopneumoniae* adhère aux cellules épithéliales ciliées du tractus respiratoire puis se multiplie en tant que pathogène extracellulaire. Cette adhérence entraîne une perte de l'activité ciliaire puis une disparition des cils ainsi qu'une production abondante de mucus (DeBey et Ross, 1994; Jacques et al., 1992). La ciliostase serait due à une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau du tractus respiratoire induite par l'activation de la phospholipase C par le pathogène, ce qui entraîne un relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  par le réticulum endoplasmique (Park et al., 2002). Il s'en suit une exfoliation épithéliale mais en l'absence de surinfection, l'épithélium respiratoire se reconstitue en quelques semaines (Kobisch et Marois, 2008). Il a été démontré dans de nombreuses études que la cytoadhérence du pathogène était nécessaire à son infectivité (DeBey et Ross, 1994; Razin et al., 1998; Zhang et al., 1995; Zielinski et Ross, 1990).

### 1.3.8 Protéines d'adhérence

L'adhérence de *M. hyopneumoniae* n'est pas médiée par une organelle spécialisée mais via des protéines et des carbohydrates présents à la surface du pathogène (Zielinski et Ross, 1993). Plusieurs protéines ont été identifiées comme étant des adhésines de *M. hyopneumoniae*.

#### 1.3.8.1 La protéine P97

La protéine P97 (ou Mhp183) est une protéine de surface de 97 kDa qui a été identifiée jusqu'à maintenant seulement chez *M. hyopneumoniae* (Zhang et al., 1995). La P97 résulte du clivage d'une protéine de 126 kDa au niveau de l'acide aminé 195. Hormis la P97, des protéines d'une taille de 22 kDa (portion N-terminale de la pré-protéine), 28 Kda (portion C-terminale de la P97 contenant la région R2) et 70 kDa (P97 sans les 28 kDa en C-terminal) résultent du clivage de cette protéine (Djordjevic



et al., 2004; Hsu et al., 1997). La P97 est constituée de deux régions contenant des motifs répétés au niveau C-terminal, les régions R1 et R2.

La région R1 est impliquée dans l'attachement du pathogène au niveau des cils de l'épithélium du tractus respiratoire (Figure 1.13). Elle est constituée pour la souche 232 de 15 répétitions de la séquence de 5 acides aminés AAKPV/E (Hsu et Minion, 1998a). Le nombre de répétitions peut varier d'une souche à une autre, cependant 8 répétitions sont nécessaires pour assurer l'attachement du pathogène (Minion et al., 2000).

La région R2, située en aval de la région R1, permet l'attachement du pathogène à la matrice extracellulaire (MEC) de l'hôte (Figure 1.13). Cependant il a été démontré que les deux régions R1 et R2 sont indispensables pour permettre la liaison du pathogène aux glycosaminoglycanes de type héparine de la MEC (Jenkins et al., 2006). La région R2 est constituée pour la souche 232 de 4 répétitions du motif de 10 acides aminés GTPNQGKKAE; le nombre de répétitions peut varier entre 3 et 5 entre les souches (Hsu et al., 1997).

```

MKELDNKIKGILPQPP*AAKPEAAKPVA*AKPETTKPVA*AKPEAAKPEAAKPVA*AKPEAA
KPVAAKPEAAKPVA*AKPEAAKPVA*AKPEAAKPV*ATNTGFSLTNKPEDYFPMASFYKLEY
TDENKLSLKTPEINVFLVLHQSEYEEQEIIKELDKTVLNLQYQFQEVKVTSDQQKLSHP
MMTE*GSSNQGKKSE*GTPNQGKKAE*GAPNQGKKAE*GTPNQGKKAEGAPSQQSPTTE
LTNYLPDLGKKIDEIHKQGKWKTEVELIEDNIAGDAKLLYFILRDDSKSGDPKKSSLKVKIT
VKQSNNNQEPESK

```

**Figure 1.13 : Séquence en acide aminés de la portion C-terminale de la P97 de *M. hyopneumoniae* souche 232.**

Cette séquence contient deux régions répétées, la R1 en rouge et la R2 en mauve. Les astérisques correspondent au début de chacune des régions répétées.



La protéine P97 a six paralogues, les protéines Mhp107, 271, 280, 385, 493 et 684. Ces paralogues ont un degré d'homologie en acides aminés supérieur à 30% à la P97. Peu de données sont disponibles concernant la fonction de ces paralogues (Minion et al., 2004). Cependant le paralogue Mhp271 serait le seul à contenir des séquences R1 et R2 retrouvées sous la forme de trois répétitions de 5 acides aminés (R1A) suivi de 2 répétitions de 10 acides aminés (R2) puis de six répétitions de 5 acides aminés (R1B). Les régions R1 et R2 de Mhp271 sont capables de se lier à l'héparine et à la fibronectine de la matrice extracellulaire (MEC) de l'hôte (Deutscher et al., 2010). La Mhp107 serait capable de lier quand à elle *in vitro* à l'héparine, la fibronectine et au plasminogène (Seymour et al., 2011). La Mhp 493 (ou P216) code pour une protéine de 216 kDa qui serait clivée en deux protéines, la P120 et la P85. Ces protéines seraient capables de se lier *in vitro* à l'héparine (Wilton et al., 2009).

L'opéron codant pour la P97 contient un autre ORF codant pour la protéine P102 (ou Mhp182). C'est une protéine de 102 kDa qui est exprimée *in vivo*. Il a été récemment démontré que la P102 était clivée en deux protéines de surface nommées P60 et P42. La P102, la P60 et la P42 sont capables de se lier au plasminogène et les P102 et P42 sont capables de se lier à la fibronectine (Seymour et al., 2012). Elle possède également 6 paralogues qui sont situés sur les mêmes opérons codant pour les paralogues de la P97. La fonction de ces paralogues est également inconnue (Adams et al., 2005; Minion et al., 2004).

Ces différentes données suggèrent donc que lors d'une infection par *M. hyopneumoniae* il y aurait une activation du système fibrinolytique via l'activation du fibrinogène par le pathogène. Le fibrinogène va permettre une activation de la fibrine qui est connue pour entraîner une dégradation de la MEC ce qui permet une meilleure exposition des protéines de la MEC telles que la fibronectine. Ceci potentialise ainsi la liaison du pathogène au niveau du tractus respiratoire et donc sa colonisation. Cependant des travaux supplémentaires devront être réalisés afin de confirmer ces hypothèses (Seymour et al., 2012).

### 1.3.8.2 Autres protéines d'adhésion

La protéine P159 (Mhp494) est clivée en 3 protéines : la P27, la P110 et la P52. Il a été démontré *in vitro* que la P52 ainsi que la portion C-terminale de la P110 étaient capables de se lier aux glycoaminoglycanes de type héparine (Burnett et al., 2006). La lipoprotéine P146 serait une protéine de surface ayant une forte homologie de séquence avec une adhésine identifiée chez *M. conjunctivae*, suggérant ainsi un rôle possible de cette protéine dans l'adhésion du pathogène (Stakenborg et al., 2006). Une glycoprotéine de 110 kDa a également été identifiée *in vitro* comme étant une adhésine de *M. hyopneumoniae* (Chen et al., 1998). Ces données suggèrent donc un aspect multifactoriel dans l'adhésion du pathogène au niveau du tractus respiratoire.

### 1.3.9 Réponse immunitaire et *M. hyopneumoniae*

#### 1.3.9.1 Réponse cellulaire et humorale

Lors d'une infection à *M. hyopneumoniae*, une suppression de la réponse immunitaire cellulaire et humorale est d'abord observée. Le pathogène est capable d'inhiber la phagocytose des macrophages rendant ainsi le porc plus sensible à une infection par un pathogène secondaire (Caruso et Ross, 1990; Redondo et al., 2009). Après la colonisation du pathogène au niveau du tractus respiratoire, une infiltration des cellules immunitaires est observable au niveau du site de l'infection. Il a été démontré que les macrophages alvéolaires jouent un rôle primordial dans l'initiation de la réponse immunitaire. Ils sont détectables dès le jour 7 PI et induisent une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, notamment de l'IL-1, du TNF- $\alpha$  et de l'IL-8, ce qui permet le recrutement et l'activation des cellules T au site de l'infection (Choi et al., 2006; Van Reeth et al., 2002). Ce recrutement de cellules entraîne une hyperplasie des tissus lymphoïdes associés aux bronches qui est caractéristique de la PEP (Redondo et al., 2009). L'accumulation des cellules T est

directement en corrélation avec la pathogénèse de *M. hyopneumoniae* étant donné que leur déplétion diminue les lésions pulmonaires (Tajima et al., 1984). Ce recrutement important de cellules immunitaires a pour conséquence le développement d'une réponse inflammatoire chronique.

Une séroconversion des porcs est détectable environ 30 jours après l'infection (Feng et al., 2010; Zhang et al., 2011b). Cependant une autre étude a rapporté le développement d'une réponse humorale à partir du jour 10 PI (Sheldrake et al., 1990). Au niveau des sécrétions broncho-alvéolaires, une augmentation des IgG et des IgA a été rapportée entre les jours 7 et 21 PI (Redondo et al., 2009). L'induction d'une réponse humorale ne corrèlerait pas avec l'induction d'une protection (Thacker et al., 2000a), mais pourrait jouer un rôle important. En effet, il a été suggéré que la présence d'IgA permettrait de prévenir la liaison du pathogène à l'épithélium respiratoire et que les IgG participeraient à l'opsonisation et à la phagocytose du pathogène (Sarradell et al., 2003). De plus il a été démontré que le transfert passif d'anticorps permet de protéger les porcelets au cours des premières semaines contre le développement de la PEP (Bandrick et al., 2008; Wallgren et al., 1998).

#### 1.3.9.2 Cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines pro-inflammatoires sont associées au développement de la pneumonie, à la pathogénèse et à la persistance de la maladie (Ahn et al., 2009; Choi et al., 2006; Thanawongnuwech et al., 2004). Une augmentation de la production d'IL-1, d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  ainsi que de la prostaglandine E2 est retrouvée au niveau des sécrétions broncho-alvéolaires (Asai et al., 1993; Asai et al., 1994). La sécrétion d'IL-6 se fait principalement au niveau des tissus hyperplasiques lymphoïdes péri-bronchiolaires alors que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  sont préférentiellement retrouvés au niveau des macrophages alvéolaires et permettent entre autres le recrutement de neutrophiles au site de l'infection ainsi que l'activation des cellules T (Ahn et al.,

2009; Ruuth et Praz, 1989). Ces cytokines apparaissent au niveau des poumons 7 jours après une infection expérimentale avec un pic au jour 21 (Redondo et al., 2009). Une forte augmentation de l'IL-18 au niveau des sécrétions broncho-alvéolaires a été également rapportée. Cependant, cette forte concentration en IL-18 n'induit pas la sécrétion d'INF- $\gamma$  (Muneta et al., 2006). Au niveau des ganglions trachéo-bronchiques, le taux d'IL-8 est augmenté et contribue également à la prolifération des lymphocytes (Zhang et al., 2011b).

Les mécanismes utilisés par *M. hyopneumoniae* afin de stimuler la réponse immunitaire innée sont inconnus. Il a seulement été démontré qu'il serait capable de stimuler le TLR2 et le TLR6 présents au niveau des macrophages alvéolaires porcins probablement via les lipoprotéines présentes en grande quantité à la surface du pathogène (Muneta et al., 2003). Il a été également démontré *in vitro* que *M. hyopneumoniae* était capable d'induire chez des lignées de macrophages murins (RAW 264.7 et MH-S) la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et d'oxyde nitrique via l'activation de la voie des MAPK et de NF- $\kappa$ B (Damte et al., 2011; Hwang et al., 2011).

### 1.3.10 Vaccins expérimentaux

Étant donné qu'il existe très peu de littérature sur la nature des antigènes de *M. hyopneumoniae*, la plupart des vaccins expérimentaux ont utilisé la P97 pour le développement de vaccins sous-unitaires. En effet, la P97 est connue pour être immunogénique, assez conservée entre les souches et de plus, elle est indispensable à l'adhésion du pathogène au niveau du tractus respiratoire, ce qui en fait un antigène de choix (Stakenborg et al., 2006; Wilton et al., 1998).

L'utilisation de la P97 produite en bactérie en mélange avec de l'adjuvant de Freund permet de réduire les signes de la pneumonie mais pas de manière significative (King et al., 1997). Par contre, l'utilisation d'une souche recombinante



d'*Erysipelothrix rhusiopathiae* exprimant la portion C-terminale de la P97 par voie nasale ou orale a permis de diminuer significativement les lésions pulmonaires de la PEP suggérant l'importance de l'immunité mucosale dans la protection contre le pathogène (Ogawa et al., 2009; Shimoji et al., 2003). Une souche recombinante de *Salmonella typhimurium* exprimant le fragment R1 de la P97 administré par voie orale n'a pas permis de générer une réponse immunitaire chez la souris Balb/c (Chen et al., 2006a). Cependant, l'utilisation d'une protéine recombinante correspondant à la région R1 de la P97 produite en bactérie fusionnée à la sous-unité B de *E. coli* (LTB) a permis de générer une bonne réponse en anticorps chez la souris aussi bien lors d'immunisation par voie intranasale qu'intramusculaire (Conceicao et al., 2006).

Des adénovirus recombinants exprimant la portion C-terminale de la P97 administrés par voie intranasale ont permis de générer une réponse immunitaire humorale et cellulaire spécifique ainsi qu'une diminution significativement des lésions pulmonaires associés à la PEP. Cependant, la protection obtenue est moins bonne que lors de l'utilisation d'un vaccin commercial suggérant l'implication future d'autres antigènes du pathogène dans le développement d'un vaccin afin d'induire une protection optimale (Okamba et al., 2010).

#### **1.4. Interaction entre le PRRSV, le PCV2 et *M. hyopneumoniae***

##### **1.4.1 Le complexe respiratoire porcin**

Les infections respiratoires porcines résultent souvent de l'interaction entre plusieurs pathogènes. Une entité clinique, nommée complexe respiratoire porcin (CRP) est une des résultantes de ces interactions et induit des pertes économiques significatives pour l'industrie porcine. Le CRP se caractérise par des troubles respiratoires, un retard de croissance, un état léthargique, de la fièvre ainsi que par une augmentation de la mortalité des porcs en post-sevrage et à l'engraissement. Le type de pathogènes impliqués dans le CRP varie d'un élevage à un autre, cependant

les deux principaux pathogènes associés au CRP sont le PRRSV et *M. hyopneumoniae*. Le PCV2 et le virus de l'influenza porcine sont aussi fréquemment retrouvés (Hansen et al., 2010; Thacker et Thanawongnuwech, 2002; Thacker, 2001).

#### **1.4.2 Interaction entre le PRRSV et *M. hyopneumoniae***

Il a été démontré que lors d'une co-infection avec ces pathogènes, une charge virale plus importante du PRRSV est retrouvée chez le porc (Cho et al., 2006). La présence de *M. hyopneumoniae*, même à un niveau sous-clinique, augmente la sévérité de la pneumonie due à une infection au PRRSV (Thacker et al., 1999). Une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires a aussi été observée, la co-infection induisant plus d'IL-1 $\beta$ , d'IL-8, d'IL-10, d'IL-12 et de TNF- $\alpha$  au niveau des sécrétions broncho-alvéolaires. Une augmentation du pourcentage de lésions macroscopiques est aussi observée. L'IL-10 pourrait être un des mécanismes qui entraîne une augmentation de la sévérité de la pneumonie observée en cas de co-infection (Thanawongnuwech et al., 2004; Thanawongnuwech et Thacker, 2003). Une étude a cependant rapporté que l'infection au PRRSV n'augmente pas la sévérité des signes cliniques dus à *M. hyopneumoniae* chez des jeunes porcs âgés de 3 semaines (Van Alstine et al., 1996).

La vaccination des animaux aurait également une incidence sur la sévérité des signes cliniques dus à ces pathogènes. Bien que certaines études ont montré que la vaccination des porcs avec les deux vaccins commerciaux simultanément induit une protection identique à l'utilisation d'un seul de ces vaccins (Drexler et al., 2010), d'autres études ont démontré que la vaccination contre le PRRSV ou une infection par le PRRSV diminuait l'efficacité de la vaccination contre *M. hyopneumoniae*. La vaccination contre *M. hyopneumoniae* diminue le nombre de lésions associées aux deux pathogènes; cependant si ces porcs reçoivent également le vaccin contre le PRRSV, le nombre de lésions dues aux deux pathogènes est augmenté (Thacker et al., 2000b).

### 1.4.3 Interaction entre le PRRSV et le circovirus porcin

Plusieurs études ont démontré que lors d'une infection par le PRRSV, la virémie du PCV2 se trouvait prolongée et augmentée (Allan et al., 2000a; Rovira et al., 2002; Sinha et al., 2011). Au niveau de la réponse immunitaire, il a été démontré que lors d'une co-infection avec ces deux pathogènes il y a une diminution plus importante d'IL-2, d'IL-4, d'IL-6, d'IL12p40 et d'INF- $\gamma$  et une augmentation plus importante du taux de TNF- $\alpha$  que lors d'une infection unique. La réponse en anticorps contre les deux pathogènes est plus longue à se mettre en place et moins importante. Une diminution très importante pendant les deux premières semaines du nombre de monocytes et lymphocytes a aussi été rapportée (Shi et al., 2008; Shi et al., 2010). Les deux pathogènes ont donc un effet synergique sur la diminution de la réponse immunitaire cellulaire et humorale de l'hôte.

La vaccination contre le PCV2 protège contre le pathogène même en présence d'une co-infection PRRSV/PCV2 (Shen et al., 2010; Sinha et al., 2010). De plus, il a été démontré lors de l'abattage des animaux que ceux ayant reçu une vaccination contre le PCV2 ont une séroprévalence pour le PRRSV moins importante, suggérant un rôle bénéfique de la vaccination pour la prévention des infections secondaires (Kixmoller et al., 2008). La vaccination contre le PRRSV permet de diminuer la virémie due à une infection par le PCV2 mais seulement chez les porcs âgés de plus de 13 semaines (Genzow et al., 2009). Il a été aussi démontré que des porcelets infectés avec le PCV2 puis vaccinés contre le PRRSV développent plus de lésions pulmonaires que des porcelets non vaccinés (Allan et al., 2007). Il a été également rapporté qu'une infection par le PCV2 diminue l'efficacité de la vaccination contre le PRRSV (Opriessnig et al., 2006c).

#### 1.4.4 Interaction entre le *M. hyopneumoniae* et le circovirus porcin

Il a été démontré que l'infection par *M. hyopneumoniae* potentialise la sévérité des lésions associées au PCV2. Elle augmente et prolonge aussi la virémie du PCV2 et ainsi augmente l'incidence des PCVAD (Opriessnig et al., 2004). Lors d'une co-infection avec ces deux pathogènes, une altération mineure du profil d'expression des cytokines a été rapportée avec seulement une augmentation des taux d'IL-10 et d'INF- $\gamma$  (Zhang et al., 2011b). Lors de la vaccination des animaux, il a été rapporté que l'âge des animaux vaccinés contre *M. hyopneumoniae* peut avoir une incidence sur la sévérité des signes cliniques dus à une infection subséquente par le PCV2 (Opriessnig et al., 2006b) et que l'utilisation de vaccin contre *M. hyopneumoniae* contenant des adjuvants huileux augmente aussi la pathogénèse du PCV2 (Krakowka et al., 2007). Cependant, la vaccination simultanée des animaux contre ces deux pathogènes permet de diminuer les signes cliniques et les lésions pulmonaires associées à ces deux pathogènes (Kim et al., 2011a).



## CHAPITRE II

### IMMUNOGENIC PROPERTIES OF REPLICATING BUT NONDISSEMINATING ADENOVECTORS EXPRESSING STRUCTURAL PROTEINS OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS

Elodie Roques<sup>1</sup>, Aurélie Girard<sup>1</sup>, Marie-Claude St-Louis<sup>1</sup>, Bernard Massie<sup>2,3</sup>,

Carl A. Gagnon<sup>4</sup>, Martin Lessard<sup>5</sup> and Denis Archambault<sup>1</sup>

#### Affiliations

<sup>1</sup> University of Québec at Montréal, Department of Biological Sciences, P.O. Box 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada.

<sup>2</sup> Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montréal, Québec, H4P 2R2, Canada.

<sup>3</sup> Adjunct professor, Department of Microbiology and Immunology, University of Montréal, P.O. Box 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada.

<sup>4</sup> Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada.

<sup>5</sup> Dairy and Swine Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 2000 College Street, Sherbrooke, Québec, J1M 1Z3, Canada.

**Contribution des auteurs:**

Ce chapitre présenté sous forme d'article scientifique est une étude préliminaire au chapitre 3. La réalisation et l'analyse des expériences ont été faites par l'auteur de cette thèse. La rédaction du manuscrit ainsi que le montage des figures ont été réalisées par l'auteur de cette thèse. Aurélie Girard et Marie-Claude St-Louis ont été impliquées respectivement dans les expériences d'immunisation et dans la production des adénovirus recombinants. Le Docteur Bernard Massie a développé le système d'adénovirus recombinants. Le Docteur Carl Gagnon a apporté son expertise scientifique. Le Docteur Martin Lessard a supervisé, coordonné et conduit les expériences d'immunisation. Le Docteur Denis Archambault a conçu et élaboré la stratégie de vaccination, supervisé le projet et corrigé le manuscrit. Tous les auteurs ont discuté des résultats, révisé et approuvé le manuscrit final. Les références de cet article se retrouvent à la fin du manuscrit.

## 2.1 Abstract

The Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is responsible for severe economic losses in infected pig herds worldwide. The current commercial PRRSV vaccines are incompletely effective in protection against PRRSV. Therefore, novel immunization strategies are needed to adequately stimulate the host immune system to ensure protection against PRRSV. As a first step towards this goal, replicating but non disseminating adenovectors (rAdVs) were developed and used as vaccine vectors to express the proteins of interest of PRRSV, namely the GP5 envelope glycoprotein which carries the major virus neutralizing epitope and the M matrix protein which, upon dimerization with GP5, enhances GP5-specific antibody (Ab) production in the host. Seven rAdVs were generated and designated GFP (expressing green fluorescent protein and used as a negative control), GP5 (expressing wild-type GP5), M-GP5 (a fusion protein co-expressing M and GP5), M-GP5m [expressing a mutant form of GP5 that has been developed to theoretically increase the neutralizing Ab (NAb) response], M-GP5-CTB (fusion of M-GP5 with the mucosal adjuvant cholerae toxin B subunit) and M-GP5m-CTB (co-expressing M-GP5m and CTB). Pigs were immunized both intramuscularly and intranasally at 3-weeks intervals with the different rAdVs. Two additional groups of pigs were either primed with M-GP5-expressing rAdVs followed by a boost with bacterially-expressed recombinant wild-type GP5 (rGP5) or immunized twice with a PRRSV inactivated commercial vaccine. Immunization with M-GP5m-expressing rAdv generated in the inoculated pigs a GP5-specific Ab response higher than that observed in pigs treated with the M-GP5- and GP5-expressing rAdVs. The results also showed that the CTB unit within in the fusion proteins had a negative effect on the GP5-specific Ab response. The prime (with the M-GP5-expressing rAdVs)-boost (with rGP5) immunization strategy elicited the highest GP5-specific Ab response. However, no pigs from all groups developed GP5-specific NAb.

**Keywords:** PRRSV, recombinant adenovirus, GP5 and M proteins, pigs, immune response.

## 2.2 Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) emerged in the late 1980s in North America (Keffaber, 1989) and then later in Europe (Wensvoort et al., 1991). Since then, the disease has spread worldwide and became one of the most serious infections in the swine industry (Holtkamp et al., 2012). PRRS is characterized by severe respiratory clinical signs associated with pneumonia in pigs of all ages and reproductive disorders in sows (Rossow, 1998). The causative agent of PRRS, the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), belongs to the *Arteviridae* family which together with the *Coronaviridae* and *Roniviridae* families constitute the order *Nidovirales* (Imler et al., 1996). The PRRSV genome is a positive, single-stranded, 5'-capped and 3'-polyadenylated mRNA molecule with a length of approximately 15 000 nucleotides (nt). It contains, in the direction 5'-3', two large virus replicase-encoding open reading frames (ORFs), ORFs 1a and 1b, which represent approximately three-quarters of the genome, and seven smaller ORFs designated 2a, 2b and 3 to 7 which express structural proteins termed GP2a, GP2b, GP3, GP4, GP5, M and N, respectively (Meulenberg, 2000).

GP5 is a glycosylated envelope protein of approximately 25 kDa carrying the major neutralizing epitope. An immunodominant region localized in the ectodomain of GP5 contains a so-called decoy epitope [amino acids (aa): 27-30 A/(V)LVN] (Ostrowski et al., 2002). Soon after infection, this epitope induces a strong non-neutralizing antibody (Ab) response and a delay in the production of neutralizing Abs (NAbs) with generally appear after three weeks post infection (Lopez et Osorio, 2004; Ostrowski et al., 2002). However, the decoy epitope is not the only way for PRRSV to escape the host Ab response. GP5 contains several N-glycosylation sites located at



or near the neutralizing epitope (aa 37 to 45: SHLQLIYNL) (Plagemann, 2004). Whereas the N44 glycosylation site is important for virus infectivity, abrogation of the N34 and N51 glycosylation sites within an infectious clone of PRRSV induces a faster and more efficient NAb response than the wild-type clone (Ansari et al., 2006b). The GP5 protein is associated within the virion to the membrane protein M via disulfide bonds (Mardassi et al., 1996). M is a non-glycosylated protein of approximately 19 kDa associated with a strong cellular immune response (Bautista et al., 1999). Co-expression of M and GP5 using various genetic vectors generates a better NAb response against GP5 than the use of GP5 alone (Jiang et al., 2006a; Jiang et al., 2007c; Zheng et al., 2007).

Although there are several vaccines commercially available, these vaccines may have several pitfalls. Attenuated live vaccines present a risk of reversion to virulence (Madsen et al., 1998) whereas inactivated vaccines may not confer optimal protection (Nielsen et al., 1997; Scotti et al., 2007). In this study, replicating but nondisseminating adenovectors (rAdVs) were used to express the PRRSV GP5 wild-type protein (GP5) alone, the matrix protein M in fusion with either GP5 (M-GP5) or with a mutant form of GP5 (M-GP5m). The two latter fusion proteins were also fused to the cholera toxin B subunit (CTB) for which an adjuvant activity has been described [19]. Two additional groups were immunized once with rAdVs expressing M-GP5 and boosted with recombinant GP5 in bacteria (M-GP5/rGP5 group) or twice with a PRRSV commercial inactivated vaccine (inactivated vaccine group). The results showed that all immunized animals have generated a GP5-specific Ab response. Animals immunized with the CTB fusion proteins developed very low levels of GP5-specific Abs whereas the highest Ab level was observed in pigs of the M-GP5/rGP5 group.

## 2.3 Material and Methods

### 2.3.1 Viruses, cells and synthetic genes

PRRSV IAF-Klop (Gagnon et al., 2003) strain was propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 8% of fetal bovine serum (FBS; PAA Laboratories, Inc., Etobicoke, Ontario) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> (Kheyar et al., 2005) and titrated in MARC-145 cells using the Kärber method (Karber, 1931).

rAdVs were propagated and titrated in the 293-PS-CymR cell line which is a cell clone derived from the human embryonic kidney (HEK) 293 cell line expressing the protease (PS) gene (Oualikene et al., 2000). Cells were grown in DMEM supplemented with 8 % FBS and 50 µg/ml cumate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere as described (Mullick et al., 2006).

The human lung cancer cell line A549 were propagated in DMEM supplemented with 8% of FBS and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Unlike HEK 293 cells, these cells do not express proteins encoded by the adenovirus E1 gene. The cells were used to confirm protein expression from the rAdVs (Oualikene et al., 2000).

The codons most frequently used in *Sus Scrofa* cells and demonstrated for their ability to increase the immune response in swine (Kheyar et al., 2005) were used to generate the GP5 (ORF5)- and M (ORF6)-encoding genes on the basis of the PRRSV IAF-Klop genome sequence [Genbank accession number: U64928] and CTB on the basis of the *Vibrio Cholerae* strain 569B sequence [Genbank accession number: x58785] (synthesized through GeneArt services; Invitrogen).

### **2.3.2 Cloning of GP5 wild-type or mutated sequences in fusion with the M sequence**

Three mutations to increase the Ab and T cell immune responses specific to GP5 were introduced by PCR in the GP5-encoding gene (Fang et al., 2006; Li et al., 2009a). The first mutation consisted in the replacement of the GCCCTGGTGAAC nucleotide (nt) sequence (aa 27-30: ALVN) by the TCTGGGTCTGGC nt sequence (aa 27-30: SGSG) to abolish the decoy ALVN epitope (Ostrowski et al., 2002). The second mutation introduced the 39 nt PADRE sequence (AKFVAAWTLKAAA) between residues 32 and 33 such that this sequence was localized between the abrogated decoy sequence and neutralizing epitope (Fang et al., 2006). The third mutation replaced the AAC triplet (N) by the GCC triplet (A) to abolish the N51 glycosylation site (Li et al., 2009a). The resultant protein produced from the mutated encoding gene was designated hereafter GP5m. GP5 wild-type- or GP5m-encoding sequences were fused by PCR to the 3' terminal of the M gene with the insertion of the GTTACCACC (GTT) linker sequence between the M and GP5-encoding nt sequences (Jiang et al., 2006a). The CTB sequence was fused by PCR to the 3' terminal of the M-GP5 or M-GP5m-encoding sequence with the insertion of the GGCCCAGGCCCC (GPGP) linker sequence (Chia et al., 2010). The sequences of GP5, M-GP5, M-GP5-CTB, M-GP5m and M-GP5m-CTB were validated by DNA sequencing through the McGill University Sequencing Services (Montréal, Québec, Canada).

### **2.3.3 Construction of recombinant adenovectors (rAdVs)**

Replicative but nondisseminating human adenoviruses serotype 5 were used in this study. The different encoding sequences generated above were inserted into the *Bgl*II site of the adenovirus transfer vector pAdenoVator-CMV5(CuO)-IRES-E1A (Bourbeau et al., 2007). The recombinant plasmids were rescued into the genome of

the pAdeasy $\Delta$ PS by homologous recombination in *E. coli* BJ5183 cells (MP Biomedicals, Irvine, CA) through electroporation (2.5 kV, 200 Ohms and 25  $\mu$ F). The recombinant rAdV genome was confirmed by PCR and restriction enzyme analysis. To produce the rAdVs, plasmids were linearized by *PacI* digestion and 293-PS-CymR cells at 60% confluency were transfected with 2  $\mu$ g of each plasmid (one well per plasmid of a 6-well plate) using PolyFect transfection reagent (Qiagen, Valencia, CA). The transfected cells were overlaid 24 h later with agarose (Invitrogen) (0.45% in DMEM supplemented with 5% FBS) and monitored daily until the appearance of viral plaques. After the confirmation of transgene expression from amplified viral clones, rAdVs were produced at a large scale and purified by double cesium chloride gradient (Bourbeau et al., 2007). The infectious dose of rAdVs was determined in 293-PS-CymR infected cells using the Kärber method and titers were expressed in tissue culture infectious dose 50 per ml (TCID<sub>50</sub>/ml).

#### 2.3.4 Western blot assay

A549 cells were seeded in 6-well tissue culture plates and infected with rAdVs at a multiplicity of infection (MOI) of one. At 24 h post-infection, cells from six wells were lysed with lysis buffer [50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% triton X-100 and EDTA-free protease-inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, IN)] and total cell protein concentration was quantified with the DC protein assay kit (Bio-Rad, Mississauga, ON, CA). For each sample, 20  $\mu$ g of total cell extract was electrophoretically separated onto 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The membranes were blocked in phosphate buffered saline (PBS) solution containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) in presence of 5% nonfat dry milk powder for 1 h at room temperature. The membranes were incubated overnight at 4°C with convalescent homologous PRRSV-specific pig antiserum obtained from a previous study (Gonin et al., 1998) and used at a 1/5,000 dilution. Following incubation, membranes were washed three times with PBS-T and then incubated for 1



h at room temperature with anti-pig horseradish peroxidase (HRP)-conjugated IgGs (Sigma-Aldrich). The signal was detected by enhanced chemiluminescence (ECL) (Perkin Elmer, Boston, MA). The membranes were then exposed to Kodak Biomax Light-1 films.

### **2.3.5 Recombinant GP5 production**

Plasmid pGEX4T1 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) encoding wild-type GP5 of the PRRSV IAF-Klop strain was obtained from a previous study (Gonin et al., 1999). Recombinant GP5 in fusion with Glutathione S-transferase (GST), designated hereafter rGP5, was produced in BL21 (DE3)pLysS competent *E. coli* cells (Promega, Madison, WI) upon induction at OD<sub>(600 nm)</sub> of 1.2 with 0.1 mM isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 4 h at 37°C. Bacterial cells were lysed by sonication in the following buffer (PBS, 0.5% Tween-20, 0.5% triton X-100, 0.5% NP40) and the whole bacteria protein extract was separated through 12% SDS-PAGE. The band corresponding to the rGP5 expected molecular weight was excised from the gel and electroeluted. The protein was dialyzed against PBS and quantified with the DC protein assay kit as described above. The identity of the eluted protein was confirmed by Western blot using convalescent PRRSV-specific pig antiserum as above. The protein stock was then stored at -80°C for further use.

### **2.3.6 Immunization of piglets**

Animal protocols were approved by the University's and the Dairy and Swine Research and Development Centre's (DSRDC) Animal Protection Institutional Committees according to the regulations of the Canadian Council for Animal Care. Seventy three-week-old, Yorkshire-Landrace x Duroc pigs from the herd located at the DSRDC, Agriculture and Agri-Food Canada (Sherbrooke, QC, Canada) were used. At weaning, pigs at 21 days of age were divided into nine groups according to a randomized complete block design. The pigs were housed in the nursery rooms of the

DSRDC swine complex. They were fed *ad libitum* with commercial non medicated feed and have access to water. The swine herd was seronegative for PRRSV, transmissible gastroenteritis virus, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* prior to the experiment.

Pigs of the GFP (n = 5), GP5 (n = 8), M-GP5 (n = 8), M-GP5-CTB (n = 7), M-GP5m (n = 8), and M-GP5m-CTB (n = 5) groups were immunized both by the intramuscular (IM) and intranasal routes (IN) at days 0 and 21 with  $10^8$  TCID<sub>50</sub> of rAdVs expressing the corresponding protein. Pigs of groups 7 (n = 7) and 8 (n = 6) were primed at day 0 IM and IN with  $10^8$  TCID<sub>50</sub> of rAdVs expressing M-GP5, and boosted at day 21 IM with 250 µg of rGP5 (group 7) or ovalbumin (group 8) and 500 µg of QuilA (Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark) mixed in equal volume with Freund's incomplete adjuvant (Sigma-Aldrich). These groups were designated M-GP5/rGP5 and M-GP5/rOVA hereafter. The latter group was added as a control group to verify that the use of QuilA and IAF did not interfere with the immune response specific to GP5. Pigs of group 9 (n = 4) were inoculated at days 0 and 21 IM with 2 ml of the commercial Ingelvac PRRSV MLV vaccine (Boehringer Ingelheim, St Joseph, MO) inactivated 1 h at 56°C (designated hereafter inactivated vaccine) prior to the pig inoculation. The inactivation process was conducted to avoid unwanted propagation of live PRRSV in the PRRSV-free swine herd of the research center. For IN immunization, pigs were sedated with stresnil (6-8 mg/kg of weight) given by the IM route. Blood samples were collected at 0, 21, 28, 35, 49 and 55 days post-immunization (dpi). At 55 dpi, pigs were sedated and anesthetized (10 mg/kg of ketamine and 5 mg/kg xylazine) prior to be euthanized by exsanguination. The animal lungs were collected to perform bronchoalveolar lavages with 30 ml of PBS, pH 7.3.

### 2.3.7 Antibody response to PRRSV

#### 2.3.7.1 Indirect ELISA

The presence of serum or bronchoalveolar lavage fluid (BALF) GP5-specific Abs was evaluated by indirect ELISA using Immulon 2HB 96-well microtiter plates (Thermo Labsystems, Franklin, MA). The plates were coated with 0.1 µg of rGP5 per well diluted in 0.05 M sodium carbonate buffered solution (pH 9.6) to a final volume of 100 µl. Following an overnight incubation at 4 °C, the plates were washed 4 times with PBS-T and then saturated with 150 µl of PBS-T containing 1% bovine serum albumin (BSA) overnight at 4°C. One hundred µl of pig serum (used at a 1/200 dilution) or BALF diluted two-fold in PBS-T with 1% BSA were added into wells (in duplicate) and incubated for 2h at 37°C. Plates were washed as described above and anti-pig HRP-conjugated IgGs (used at a 1/10,000 dilution) or anti-pig HRP-conjugated IgA (used at a 1/25,000 dilution) (AbD Serotec, Raleigh, NC) in PBS-T with 1% BSA were added for 1 h at 37°C. Plates were washed and the HRP signal was detected by adding 100 µl of tetramethylbenzidine (TMB, Sigma-Aldrich) per well. After an incubation of 20 min at room temperature, the reaction was stopped by adding 50 µl 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to each well. Optical density (OD) was determined at 450 nm (using Tecan Infinite M1000 reader, Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland). For each serum sample, the average OD was corrected by subtracting the OD of uncoated well from the OD obtained with antigen-coated well.

#### 2.3.7.2 Serum neutralization assay

Serum or BALF samples were heat inactivated at 56°C for 30 min. Serial two-fold dilutions (starting at 1/2) of each sample were done in DMEM, and the neutralization test was performed by a viral cytopathic effect inhibition method using the PRRSV IAF-Klop strain, 10<sup>5</sup> cells/well of MARC-145 cells plated the day before the assay and four wells per specimen dilution (Dea et al., 1996). The NAb titer was

calculated at 96 h post cell infection and expressed as the reciprocal of the highest sample dilution neutralizing 100 TCID<sub>50</sub> of the virus.

### **2.3.8 Statistical analyses**

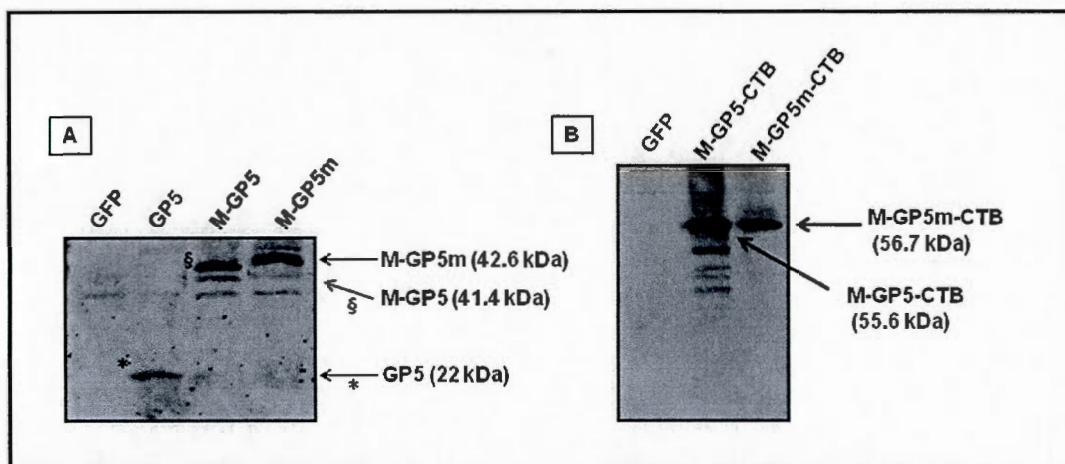
When indicated, data were analyzed with a Proc MIX procedure of SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Analysis of differences of Ab responses to GP5 in sera was performed with a Kruskal-Wallis test with Bonferroni adjustment. The other data (Ab responses to GP5 in BALF) were analyzed by ANOVA with Tukey adjustment.

## **2.4 Results**

### **2.4.1 Expression of recombinant adenovectors (rAdVs)**

Expression of proteins was detected by Western blot 24 h after infection of A549 cells with rAdVs expressing the different proteins. As shown in Fig. 2.1A, GP5, M-GP5 and M-GP5m proteins were expressed at the expected 22, 41.4 and 42.6 kDa molecular weights, respectively. M-GP5-CTB and M-GP5m-CTB fusion proteins were expressed at the expected molecular weight of 55.6 and 56.7 kDa, respectively.



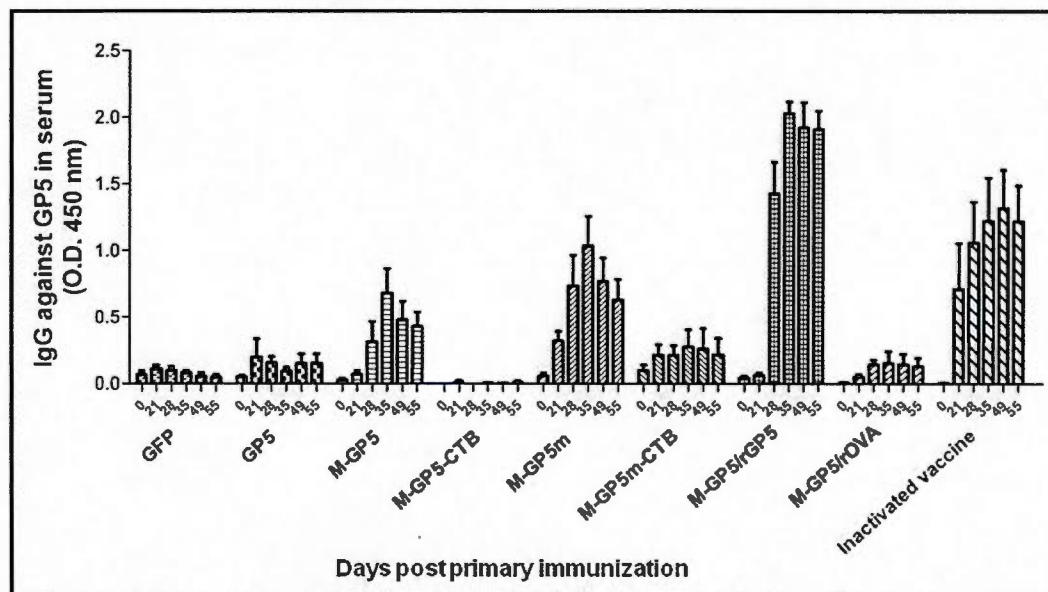


**Figure 2.1: Expression of recombinant adenovectors (rAdVs) *in vitro*.**

Western-blot analysis of A549 cell lysates infected with rAdVs (MOI of 1) expressing GFP, M-GP5 and or M-GP5m (A) or M-GP5-CTB and M-GP5m-CTB (B). Immunoblot was performed using a convalescent PRRSV-specific pig antiserum as primary antibody and an anti-pig IgG-HRP as secondary antibody.

#### 2.4.2 Antibody (Ab) response in pig sera

As shown in Fig. 2.2, pigs inoculated with rAdVs expressing M-GP5 developed a GP5-specific Ab response that was higher from 35 dpi than that of the GP5 group ( $P < 0.05$ ) but lower from 21 dpi than that of the M-GP5m group ( $P < 0.05$ ). No GP5-specific Ab response was detected in pigs vaccinated with rAdVs expressing M-GP5-CTB. Pigs of the M-GP5m-CTB group developed GP5-specific Abs, the levels of which were, however, lower than those of the M-GP5m group from 28 dpi ( $P < 0.05$ ). Pigs of the M-GP5/rGP5 group developed a higher GP5-specific Ab response than that of the M-GP5m and inactivated vaccine groups from 35 dpi ( $P < 0.05$ ). As expected, pigs of the M-GP5/rOVA group developed a weak level of GP5-specific Abs compared to that of the M-GP5/rGP5 group. Finally, pigs inoculated with the inactivated vaccine developed a higher immune response than that of the M-GP5m group from 49 dpi ( $P < 0.05$ ). The presence of NAbs was not detected in sera of any immunized pigs of all groups. Finally, no GST-specific Abs were detected in pigs inoculated with rGP5 (not shown).

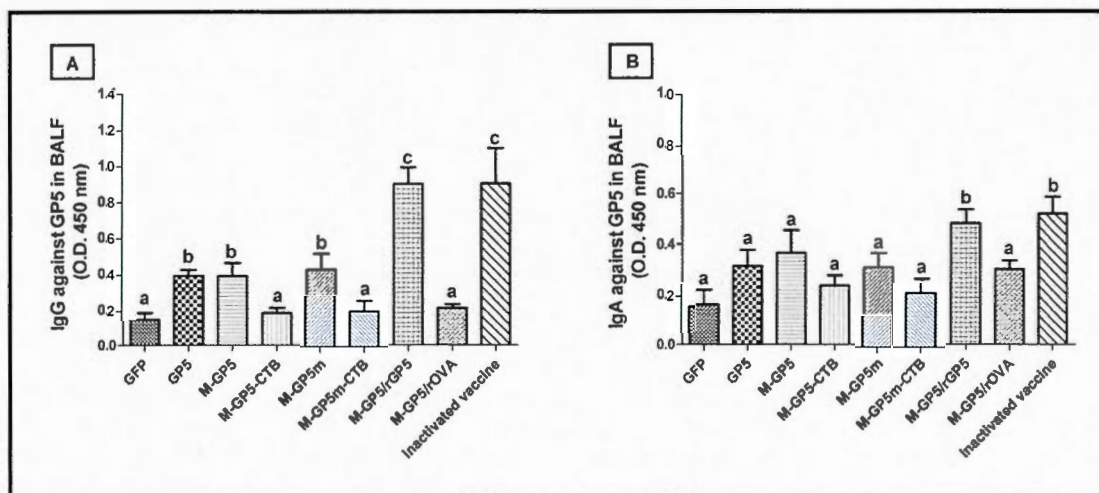


**Figure 2.2: Antibody responses in sera of pigs immunized with recombinant adenovectors.**

IgGs specific to GP5 were detected in serum samples of pigs at various time points by indirect ELISA. Data are expressed as the mean + SEM.

#### 2.4.3 Antibody response in pig bronchoalveolar lavage fluid (BALF)

The presence of GP5-specific IgG and IgA in BALF of each pig was determined by ELISA at 55 dpi (Fig. 2.3A and 2.3B respectively). Pigs of the GP5, M-GP5 and M-GP5m groups developed similar GP5-specific IgG response whereas no significant IgG levels were obtained in pigs of the GP5/rOVA, M-GP5-CTB and M-GP5m-CTB groups when compared to the GFP group. Pigs of the M-GP5/rGP5 and inactivated vaccine groups generated the best and comparable GP5-specific IgG response against GP5 (shown in Fig. 2.3B). Only pigs of M-GP5/rGP5 and inactivated vaccine groups developed a significantly higher IgA immune response than the GFP group ( $p < 0.0005$ ) but there was no statistically differences between these two groups. CTB fusion proteins generated a lower IgA Ab response than M-GP5 or M-GP5m although the responses were not significantly different. Like the serum results, no NAbs were detected in any pigs.



**Figure 2.3: Antibody responses in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of pigs immunized with recombinant adenovectors.**

BALF of pigs were collected at 55 days post primary immunization. IgG (A) or IgA (B) specific to GP5 were determined by indirect ELISA. Data are shown as the mean + SEM. When 2 sets of data are labeled with superscripts of different letters, it indicates that these two sets of data are statistically different ( $P < 0.05$ ).

## 2.5 Discussion

In this study, replicative but nondisseminating AdVs were used to express PRRSV proteins and to immunize pigs, allowing induction of PRRSV-specific immune response. As shown in previous studies (Jiang et al., 2006a; Zheng et al., 2007), fusion of M protein to GP5 was better to induce a specific Ab response to GP5 than the use of GP5 alone. Pigs immunized here with M-GP5-expressing rAdVs developed a higher GP5-specific Ab response than that of the GP5 group. Several mutations were introduced in GP5. Pigs immunized with the M-GP5m-expressing rAdVs developed a better Ab response than the M-GP5 group as determined by ELISA. However no PRRSV-specific NAb were detected in pigs of any of these groups. The mutations within GP5m were expected to allow optimal NAb response. The first mutation introduced in GP5m abolishes the decoy epitope which, if present, masks the neutralizing epitope, generating a robust non NAb immune response



(Ostrowski et al., 2002). Moreover, the same mutation abolishes the glycan at residue N30, the result of which would result in a better NAb response (Jiang et al., 2007b). The second mutation consisted in inserting the PADRE sequence between the decoy and neutralizing epitopes. The PADRE sequence is known to increase the Ab and T cell immune response (Fang et al., 2006; Jiang et al., 2009). The last mutation consisted in abrogation of the glycan at residue N51 to allow the virus to be more susceptible to *in vitro* neutralization (Ansari et al., 2006b; Vu et al., 2011). As it was previously shown that pigs immunized with rAdVs expressing GP5 or with an inactivated vaccine developed NAbs only after experimental infection with PRRSV (Gagnon et al., 2003; Misinzo et al., 2006; Quan et al., 2010), experimental challenge of the immunized pigs might be necessary for induction of NAbs.

CTB was fused to M-GP5 or M-GP5m in order to improve the immunogenicity of these proteins. CTB is a mucosal adjuvant that, when fused to antigens (Harakuni et al., 2005; Kim et Langridge, 2003; Matoba et al., 2004; Tsuji et al., 2001) is believed to enhance antigen presentation by the dendritic cells (Chen et al., 2010a). In this study, pigs immunized with rAdVs expressing M-GP5-CTB or M-GP5m-CTB developed weak or no Ab response against GP5. This is likely due to a steric hindrance mechanism that would have masked at a certain degree the GP5 epitopes.

The M-GP5/rGP5 group of pigs showed the highest systemic Ab response among all experimental groups. Indeed, this response was obtained from one week following inoculation with rGP5. Despite this robust immune response, no NAbs were detected in the immunized pigs. The inactivated vaccine group developed systemic GP5-specific Ab response that was higher than the M-GP5m group but lower than the M-GP5/rGP5 group. IgA and IgG antibodies were also detected in the lung lavages of animals of the inactivated vaccine group. As animals were only vaccinated by the IM route in contrast to the other groups of pigs inoculated by the IM and IN routes, the presence of these Abs in the lung lavages is likely due to their passive transudation from the plasma through the lung mucous membranes (Belyakov et Ahlers, 2009).



In summary, rAdVs expressing M-GP5m was better than rAdVs expressing M-GP5 or GP5 alone to induce a GP5-specific Ab response in pigs. Prime-immunization with rAdVs expressing M-GP5 followed by a boost with rGP5 produced in bacteria conferred the higher GP5-specific Ab levels in animals. Whether protection of immunized pigs from experimental challenge could be achieved remains to be investigated.

## **2.6 Acknowledgements:**

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, strategic program), Agriculture and Agri-Food Canada (AAC), the "Conseil pour le Développement de l'Agriculture du Québec" (CDAQ), the "Fédération des Producteurs de Porcs du Québec" (FPPQ), and "les Conseils d'Adaptation du porc de l'Alberta, du Manitoba et de la Saskatchewan". E. Roques was supported by graduate student fellowships from the "Centre de Recherche en Infectiologie Porcine" (CRIP) and "La Fondation UQAM". The authors thank Frédéric Beaudoin, Nedzad Music, Wilfried Saron, Andrea Gomez for technical assistance and/or helpful discussion, Steve Méthot for statistical analyses of the data and all employees in taking care of animals during the project.

## CHAPITRE III

### IMMUNOGENIC AND PROTECTIVE PROPERTIES OF GP5 AND M STRUCTURAL PROTEINS OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS EXPRESSED FROM REPLICATING BUT NONDISSEMINATING ADENOVECTORS

Elodie Roques<sup>1</sup>, Aurélie Girard<sup>1</sup>, Marie-Claude St-Louis<sup>1</sup>, Bernard Massie<sup>2,3</sup>, Carl A. Gagnon<sup>4</sup>, Martin Lessard<sup>5</sup> and Denis Archambault<sup>1</sup>

#### Affiliations

<sup>1</sup> University of Québec at Montréal, Department of Biological Sciences, P.O. Box 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada.

<sup>2</sup> Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montréal, Québec, H4P 2R2, Canada.

<sup>3</sup> Adjunct professor, Department of Microbiology and Immunology, University of Montréal, P.O. Box 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada.

<sup>4</sup> Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada.

<sup>5</sup> Dairy and Swine Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 2000 College Street, Sherbrooke, Québec, J1M 1Z3, Canada.

**Contribution des auteurs:**

Ce chapitre présenté sous forme d'article scientifique a été accepté pour publication dans la revue *Veterinary Research*. La réalisation et l'analyse des expériences ont été faites par l'auteur de cette thèse. La rédaction du manuscrit ainsi que le montage des figures ont été réalisées par l'auteur de cette thèse. Aurélie Girard et Marie-Claude St-Louis ont été impliquées respectivement dans les essais de lymphoprolifération et dans la production des adénovirus recombinants. Le Docteur Bernard Massie a développé le système d'adénovirus recombinants. Le Docteur Carl Gagnon a supervisé, coordonné et conduit la phase d'infection expérimentale. Le Docteur Martin Lessard a supervisé, coordonné et conduit les expériences d'immunisation. Le Docteur Denis Archambault a conçu et élaboré la stratégie de vaccination, supervisé le projet et corrigé le manuscrit. Tous les auteurs ont discuté des résultats, révisé et approuvé le manuscrit final. Les références de cet article se retrouvent à la fin du manuscrit.

### 3.1 Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is responsible for significant economic losses in the porcine industry. Currently available commercial vaccines do not allow optimal and safe protection. In this study, replicating but nondisseminating adenovectors (rAdV) were used for the first time in pigs for vaccinal purposes. They were expressing the PRRSV matrix M protein in fusion with either the envelope GP5 wild-type protein (M-GP5) which carries the major neutralizing antibody (NAb)-inducing epitope or a mutant form of GP5 (M-GP5m) developed to theoretically increase the NAb immune response. Three groups of fourteen piglets were immunized both intramuscularly and intranasally at 3-week intervals with rAdV expressing the green fluorescent protein (GFP, used as a negative control), M-GP5 or M-GP5m. Two additional groups of pigs were primed with M-GP5m-expressing rAdV followed by a boost with bacterially-expressed recombinant wild-type GP5 or were immunized twice with a PRRSV inactivated commercial vaccine. The results show that the rAdV expressing the fusion proteins of interest induced systemic and mucosal PRRSV GP5-specific antibody response as determined in an ELISA. Moreover the prime with M-GP5m-expressing rAdV and boost with recombinant GP5 showed the highest antibody response against GP5. Following PRRSV experimental challenge, pigs immunized twice with rAdV expressing either M-GP5 or M-GP5m developed partial protection as shown by a decrease in viremia overtime. The lowest viremia levels and/or percentages of macroscopic lung lesions were obtained in pigs immunized twice with either the rAdV expressing M-GP5m or the PRRSV inactivated commercial vaccine.

**Keywords:** PRRSV, recombinant adenovirus, GP5 and M proteins, pigs, immune response.



### 3.2 Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) emerged in the late 1980s in North America (Keffaber, 1989) and then later in Europe (Wensvoort et al., 1991). Since then, the disease has spread worldwide and become one of the most serious infections in the swine industry with an estimated loss of \$ 664 million per year in the USA in 2011 (Holtkamp et al., 2012). PRRS is characterized by severe respiratory clinical signs associated with pneumonia in pigs of all ages and reproductive disorders in sows associated with late term abortion or premature farrowing and an increased number of stillborn piglets (Rossow, 1998).

The causative agent of PRRS, the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), belongs to the *Arteriviridae* family which together with the *Coronaviridae* and *Roniviridae* families constitute the *Nidovirales* order (Cavanagh, 1997). The PRRSV genome is a positive, single-stranded, 5'-capped and 3'-polyadenylated mRNA molecule with a length of approximately 15 000 nucleotides (nt). It contains, in the direction 5'-3', two large open reading frames (ORF), ORF 1a and 1b, which encode the viral replicase and represent approximately three-quarters of the genome, and seven smaller ORF designated 2a, 2b and 3 to 7 which express structural proteins termed GP2a, GP2b, GP3, GP4, GP5, M and N, respectively (Meulenberg, 2000). An additional structural protein, GP5a, exists and is encoded by an alternative ORF from the subgenomic viral mRNA encoding GP5 (Johnson et al., 2011).

GP5 is a glycosylated envelope protein of approximately 25 kDa, carrying the major neutralizing epitope. An immunodominant region localized in the ectodomain of GP5 contains a so-called decoy epitope (amino acids (aa): 27–30 A/(V)LVN) (Ostrowski et al., 2002). Soon after infection, this epitope induces a strong non-neutralizing antibody (Ab) response and a delay in the production of neutralizing Ab (NAb) which generally appears after three weeks post infection (Lopez et Osorio, 2004; Ostrowski et al., 2002). However, the decoy epitope is not the only way for

PRRSV to escape the host Ab response. GP5 contains several N-glycosylation sites located at or near the neutralizing epitope (aa 37 to 45: SHLQLIYNL) (Plagemann, 2004). Abrogation of the N34 and N51 glycosylation sites within an infectious clone of PRRSV induces in the pig a faster and more efficient NAb response than the wild-type clone (Ansari et al., 2006b). In contrast, it was reported that wild-type PRRSV strain induces a more rapidly and more strongly NAb response in infected pigs than natural mutant isolates carrying a disrupted N44 glycosylation site (Faaberg et al., 2006). The GP5 protein is associated within the virion to the membrane protein M via disulfide bonds (Mardassi et al., 1996). M is a non-glycosylated protein of approximately 19 kDa associated with a strong cellular immune response (Bautista et al., 1999). The use of GP5 either co-expressed or in fusion with M using various genetic vectors generates a better NAb response against GP5 than the use of GP5 alone (Jiang et al., 2006a; Jiang et al., 2007c; Zheng et al., 2007).

Although there are several vaccines commercially available, these may have several pitfalls. Attenuated live vaccines present a risk of reversion to virulence (Madsen et al., 1998) whereas inactivated vaccines may not confer optimal protection (Nielsen et al., 1997; Scotti et al., 2007). Because of this, several vaccine strategies have been developed against PRRSV. Most of these strategies rely on the use of DNA-based vaccines (Barfoed et al., 2004; Fang et al., 2006; Hou et al., 2008; Jiang et al., 2009; Li et al., 2009a; Zhang et al., 2011a), transgenic plants (Chen et al., 2011; Chia et al., 2011), bacterial vectors (Bastos et al., 2004; Han et al., 2011; Jiang et al., 2004), or viral vectors. Among the viral vectors used are non-replicative human (Cao et al., 2010; Gagnon et al., 2003; Jiang et al., 2006a; Jiang et al., 2007a; Jiang et al., 2008; Jiang et al., 2007b; Kheyar et al., 2005; Li et al., 2009b; Wang et al., 2009b) and canine adenoviruses (Zhou et al., 2010), transmissible gastroenteritis virus (Cruz et al., 2010), the modified strain of vaccinia virus (Zheng et al., 2007), pseudorabies virus (Jiang et al., 2007c; Qiu et al., 2005) and fowlpox virus (Shen et al., 2007). Approximately half of these immunization studies were conducted in pigs that were then exposed to an experimental challenge, but only a few compared their efficacy

with commercially-available vaccines (Jiang et al., 2009; Jiang et al., 2007c; Qiu et al., 2005). In all these strategies a partial protection of immunized pigs was demonstrated (Cruz et al., 2010).

Replicating but nondisseminating human adenoviruses serotype 5 (rAdV) have been developed. These adenovectors are devoid of functional protease (PS) gene, preventing the maturation process of capsid proteins and assembly of viral particles (Oualikene et al., 2000). For this reason these vectors are considered safe because of their inability to spread among the population (Bourbeau et al., 2007). In addition, these vectors are functional in the E1A gene, allowing replication of the viral genome, and, thereof, expression of the proteins of interest to high levels within the inoculated host (Bourbeau et al., 2007). Finally, these adenovectors are of the human type rendering them very attractive for use in the pig which is fully permissive to the vector and does not have vector-specific pre-existing immunity (Ferreira et al., 2005). In this study, the rAdV described above were used for the first time in pigs. rAdV were generated to express the PRRSV M protein in fusion with GP5 wild-type (M-GP5) or with a mutant form of GP5 (M-GP5m) that theoretically increases NAb response. Pigs were immunized with rAdV expressing GFP (negative control), M-GP5 or M-GP5m. Two additional groups were immunized once with rAdV expressing M-GP5m and boosted with recombinant bacterial GP5 (M-GP5m/rGP5 group) or twice with a PRRSV commercial inactivated vaccine (inactivated vaccine group) respectively. The results show that all immunized animals generated a GP5-specific Ab response. Pigs of the M-GP5m/rGP5 group developed the highest Ab response. Pigs that received the rAdV expressing M-GP5m or the inactivated vaccine twice showed the lowest viremia levels and/or percentages of macroscopic lung lesions after an experimental challenge with PRRSV.

### 3.3 Material and Methods

#### 3.3.1 Viruses, cells and synthetic genes

PRRSV IAF-Klop (Gagnon et al., 2003) and FMV09-1155278 (C.A. Gagnon, unpublished) strains were propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 8% fetal bovine serum (FBS; PAA Laboratories, Inc., Etobicoke, Ontario, USA) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> (Kheyar et al., 2005) and titrated in MARC-145 cells using the Kärber method (Karber, 1931).

rAdV were propagated and titrated in the 293-PS-CymR cell line which is a cell clone derived from the HEK 293 cell line expressing the protease (PS) gene (Oualikene et al., 2000). Cells were grown in DMEM supplemented with 8 % FBS and 50 µg/mL cumate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere as described (Mullick et al., 2006).

A549 cells were propagated in DMEM supplemented with 8% of FBS and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Unlike the HEK 293 cells, these do not express proteins encoded by the adenovirus E1 gene and were used to confirm protein expression from the rAdV (Oualikene et al., 2000).

The codons most frequently used in *Sus scrofa* cells and demonstrated for their ability to increase the immune response in swine (Kheyar et al., 2005) were used to generate the GP5 (ORF5)- and M (ORF6)-encoding genes (synthesized through GeneArt services; Invitrogen) on the basis of the PRRSV IAF-Klop genome sequence [Genbank accession number: U64928].

#### 3.3.2 Cloning of GP5 wild-type or mutated sequences in fusion with the M sequence

Three mutations to increase the Ab and T cell immune responses specific to GP5 (Fang et al., 2006; Li et al., 2009a) were introduced by PCR in the GP5-encoding



gene. The first mutation consisted in the replacement of the GCCCTGGTGAAC nucleotide (nt) sequence (aa 27–30: ALVN) by the TCTGGGTCTGGC nt sequence (aa 27–30: SGSG) to abolish the decoy ALVN epitope (Ostrowski et al., 2002). The second mutation introduced the 39 nt PADRE sequence (AKFVAAWTLKAAA) between residues 32 and 33 such that this sequence was localized between the abrogated decoy sequence and neutralizing epitope (Fang et al., 2006). The third mutation replaced the AAC triplet (N) by the GCC triplet (A) to abolish the N51 glycosylation site (Li et al., 2009a). The resultant protein produced from the mutated encoding gene was designated hereafter GP5m. GP5 wild-type- or GP5m-encoding sequences were fused by PCR to the 3' terminal of the M gene with the insertion of the GTTACCACC (GTT) linker sequence between the M and GP5-encoding nt sequences (Jiang et al., 2006a). The sequences were validated by DNA sequencing through the McGill University Sequencing Services (Montréal, Qc, Canada).

### 3.3.3 Construction of recombinant adenoviruses (rAdV)

The M-GP5- and M-GP5m-encoding sequences were inserted into the *Bgl*III site of the adenovirus transfer vector pAdenoVator-CMV5(CuO)-IRES-E1A (Bourbeau et al., 2007). The recombinant plasmids were rescued into the genome of the pAdeasyΔPS by homologous recombination in *E. coli* BJ5183 cells (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) through electroporation (2.5 kV, 200 Ohms and 25 μF). The recombinant rAdV genome was confirmed by PCR and restriction enzyme analysis. To produce the rAdV, plasmids were linearized by *Pac*I digestion and 293-PS-CymR cells at 60% confluency were transfected with 2 μg of each plasmid (one well per plasmid of a 6-well tissue culture plate) using PolyFect transfection reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA). The transfected cells were overlaid 24 h later with agarose (Invitrogen) (0.45% in DMEM supplemented with 5% FBS) and monitored daily until the appearance of viral plaques. After the confirmation of transgene expression from amplified viral clones, rAdV were produced at a large scale and purified by

double cesium chloride gradient (Bourbeau et al., 2007). The infectious dose of rAdV was determined in 293-PS-CymR infected cells using the Kärber method and titers were expressed in tissue culture infectious dose 50 per mL (TCID<sub>50</sub>/mL).

### 3.3.4 Western blot assay

A549 cells were seeded in 6-well tissue culture plates and infected with rAdV with a multiplicity of infection (MOI) of one. At 24 h post-infection, cells were lysed with lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% triton X-100 and EDTA-free protease-inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, IN, USA)) and total cell protein concentration was quantified with the DC protein assay kit (Bio-Rad, Mississauga, ON, CA, USA). For each sample, 20 µg of total cell extract was electrophoretically separated onto 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The membranes were blocked in phosphate buffered saline (PBS) solution, pH 7.3, containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) in the presence of 5% nonfat dry milk powder for 1 h at room temperature. The membranes were incubated overnight at 4°C with convalescent homologous PRRSV-specific pig antiserum obtained from a previous study (Gonin et al., 1998) used at a 1/5 000 dilution, or mouse monoclonal Abs specific to either adenovirus E1A (1/5 000) (Millipore, Bedford, MA, USA), GFP (1/5 000) (Roche) or GAPDH (1/10 000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) proteins. Following incubation, membranes were washed three times with PBS-T and then incubated for 1 h at room temperature with anti-pig horseradish peroxidase (HRP)-conjugated IgG (Sigma-Aldrich) or anti-mouse-HRP-conjugated IgG (Bethyl, Montgomery, TX, USA). The signal was detected by enhanced chemiluminescence (ECL) (Perkin Elmer, Boston, MA, USA). The membranes were then exposed to Kodak Biomax Light-1 films.

### 3.3.5 Recombinant GP5 production

Plasmid pGEX4T1 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) encoding wild-type GP5 of the PRRSV IAF-Klop strain was obtained from a previous study (Gonin et al., 1999). Recombinant GP5 in fusion with Glutathione S-transferase (GST), designated hereafter rGP5, was produced in BL21 (DE3)pLysS competent *E. coli* cells (Promega, Madison, WI, USA) upon induction at OD<sub>(600 nm)</sub> of 1.2 with 0.1 mM isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 4 h at 37°C. Bacterial cells were lysed by sonication in buffer (PBS, 0.5% Tween-20, 0.5% triton X-100, 0.5% NP40) and the whole bacteria protein extract was separated through 12% SDS-PAGE. The band corresponding to the rGP5 expected molecular weight was excised from the gel and electroeluted. The purified protein was dialyzed against PBS. The protein concentration was quantified with the DC protein assay kit as described above. The identity of the eluted protein was confirmed by Western blot using convalescent PRRSV-specific pig antiserum as above. The protein stock was then stored at -80°C for further use.

### 3.3.6 Immunization of piglets and experimental challenge

Animal protocols were approved by the University's and the Dairy and Swine Research and Development Centre's (DSRDC) Animal Protection Institutional Committees according to the regulations of the Canadian Council for Animal Care. Seventy, three-week-old, Yorkshire-Landrace x Duroc pigs from the herd located at the DSRDC, Agriculture and Agri-Food Canada (Sherbrooke, QC, Canada) were used. At weaning, pigs at 21 days of age were divided into five groups of 14 pigs according to a randomized complete block design. The pigs were housed in the nursery rooms of the DSRDC swine complex. For each group, six pigs were kept separately for subsequent experimental challenge. Pigs were fed *ad libitum* with commercial non-medicated feed and had access to water. The swine herd was

seronegative for PRRSV, transmissible gastroenteritis virus, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* prior to the experiment.

Pigs of three groups were immunized by both the intramuscular (IM) and intranasal (IN) routes at days 0 and 21 with  $10^8$  TCID<sub>50</sub> of rAdV expressing GFP (negative control), M-GP5 or M-GP5m. Pigs of group four were primed at day 0 IM and IN with  $10^8$  TCID<sub>50</sub> of rAdV expressing M-GP5m, and boosted at day 21 IM with 250 µg of rGP5 supplemented with 500 µg of QuilA (Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark), and mixed in equal volume with Freund's incomplete adjuvant (Sigma-Aldrich). This group was designated M-GP5m/rGP5 hereafter. Pigs of group five were inoculated at days 0 and 21 IM with 2 mL of the commercial Ingelvac PRRSV MLV vaccine (Boehringer Ingelheim, St Joseph, MO, USA) inactivated 1 h at 56°C prior to the inoculation (designated hereafter as the inactivated vaccine). The inactivation process was conducted to avoid unwanted propagation of live PRRSV in the PRRSV-free swine herd of the research center. For IN immunization, pigs were sedated with stresnil (6–8 mg/kg of weight) given by the IM route. Blood samples were collected at 0, 21, 28, 35 and 49 days post-immunization (dpi). At 49 dpi, 8 pigs of each group were sedated and anesthetized (10 mg/kg of ketamine and 5 mg/kg xylazine) prior to being euthanized by exsanguination. The animal lungs were collected to perform bronchoalveolar lavage with 30 mL of PBS, pH 7.3.

The remaining pigs ( $n = 6$ ) of each group were transferred at 42 dpi to the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montréal for experimental challenge. After an adaptation time of 7 days, the pigs were challenged (e.g. at 49 dpi) IN with  $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of the PRRSV FMV09-1155278 strain. The FMV09-1155278 strain was selected for experimental challenge on the basis of preliminary experiments in two pigs showing viremia from day 3 following infection with the virus. Animals were monitored daily for the presence of clinical signs of cough, dyspnea, diarrhea and inappetence. Blood samples were collected and rectal temperature was monitored at 0, 3, 5, 7, 10, 14 and 21 days post-challenge (dpc). Animals were weighed at days



0, 7, 14 and 21 dpc to determine the average daily body weight gain. At 21 dpc, pigs were euthanized to perform bronchoalveolar lavage with 30 mL of PBS as described above and for pathological examination. Determination of the percentage of macroscopic lung lesions, based on the consolidation of lung tissues, was determined according to a scoring system described elsewhere (Sorensen et al., 2006).

### **3.3.7 Antibody response to PRRSV**

#### **3.3.7.1 Indirect ELISA**

The presence of serum or bronchoalveolar lavage fluid (BALF) GP5-specific Abs was evaluated by an indirect ELISA using Immulon 2HB 96-well microtiter plates (Thermo Labsystems, Franklin, MA, USA). The plates were coated with 0.1 µg of rGP5 per well diluted in 0.05 M sodium carbonate buffered solution (pH 9.6) to a final volume of 100 µL. Following an overnight incubation at 4°C, the plates were washed 4 times with PBS-T and then saturated with 150 µL of PBS-T containing 1% bovine serum albumin (BSA) overnight at 4°C. One hundred µL of pig serum (used at a 1/200 dilution) or BALF diluted two-fold in PBS-T with 1% BSA were added into wells (in duplicate) and incubated for 2 h at 37°C. Plates were washed as described above and anti-pig HRP-conjugated IgG (used at a 1/10 000 dilution) or anti-pig HRP-conjugated IgA (used at a 1/25 000 dilution) (AbD Serotec, Raleigh, NC, USA) in PBS-T with 1% BSA were added for 1 h at 37°C. Plates were washed and the HRP signal was detected by adding 100 µL of tetramethylbenzidine (TMB, Sigma-Aldrich) per well. After an incubation of 20 min at room temperature, the reaction was stopped by adding 50 µL 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to each well. Optical density (OD) was determined at 450 nm (using Tecan Infinite M1000 reader, Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland). For each serum sample, the average OD was corrected by subtracting the OD of the uncoated well from the OD obtained with the antigen-coated well.

### 3.3.7.2 ELISA IDEXX

The IDEXX PRRS X3 HerdChek ELISA (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) was used for detection of PRRSV-specific Abs in serum of animals. Serum samples with a calculated S/P ratio greater than 0.4 were considered positive as recommended by the manufacturer.

### 3.3.7.3 Serum neutralization assay

Serum or BALF samples were heat inactivated at 56°C for 30 min. Serial two-fold dilutions (starting at 1/2) of each sample were done in DMEM, and the neutralization test was performed by a viral cytopathic effect inhibition method using the IAF-Klop or FMV09-1155278 strain,  $10^5$  cells/well of MARC-145 cells plated the day before the assay and four wells per specimen dilution (Dea et al., 1996). The NAb titer was calculated at 96 h post cell infection and expressed as the reciprocal of the highest sample dilution neutralizing 100 TCID<sub>50</sub> of the virus.

### 3.3.8 Cellular immune response to PRRSV

Swine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from pigs to be challenged afterwards with PRRSV were isolated at 28, 35 and 49 dpi by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque Plus (specific density of 1.077 g/mL; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). PBMC were suspended in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI; Invitrogen) supplemented with penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 µg/mL) (Invitrogen), 10% FBS, 0.05 mM β-mercaptoethanol (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, USA) and 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, Invitrogen). PBMC were seeded at a concentration of  $4 \times 10^5$  cells per well in 96-well plates. Quadruplicate wells were exposed to 25 µL of either 200 TCID<sub>50</sub> of heat-inactivated PRRSV IAF-Klop strain, cell culture medium (control cell cultures), or 1 µg/mL of Concanavalin

A (Con A; Sigma-Aldrich) used as a positive control for lymphocyte functional activity. All cell cultures were incubated for 3 days at 37°C, and pulsed with 0.5  $\mu$ Ci of tritiated thymidine (specific activity, 6.7 Ci/mmol, Perkin Elmer) 18 h before harvesting cells onto a Wallac silica membrane (Perkin Elmer). The bound radioactivity was measured with Wallac Microbeta 1450 Trilux liquid scintillation counter (Perkin Elmer). The cell blastogenic responses were expressed by calculating the stimulation index (SI) which represents the ratio of the mean counts per minute (CPM) incorporated by the virus or mitogen-stimulated containing cell cultures to the mean CPM incorporated by the control cell cultures.

### **3.3.9 RNA extraction and PRRSV real-time PCR**

The QIAamp Viral RNA kit (Qiagen) was used to isolate viral RNA from the serum samples at 0, 5, 7 and 10 dpc as described in the manufacturer's instructions. A commercial PRRSV real-time PCR diagnostic kit (NextGen, Tetracore Inc., Gaithersburg, MD, USA) was used for PRRSV quantification as recommended by the manufacturer. The quantification of PRRSV was determined by comparing the sample results with a standard curve based on the amount of serially diluted IAF-Klop strain produced in MARC-145 cells and titrated as TCID<sub>50</sub>/mL of viral particles in the MARC-145-infected cell culture supernatant (Gagnon et al., 2008). The PRRSV qRT-PCR results were expressed in TCID<sub>50</sub>/mL of serum.

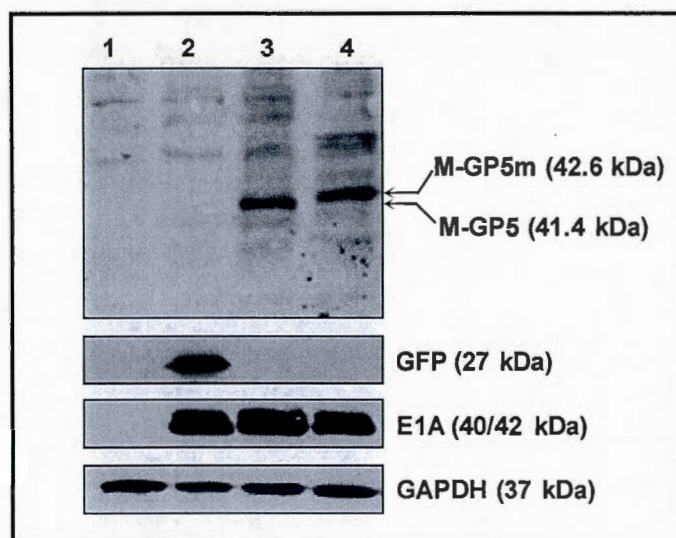
### **3.3.10 Statistical analyses**

Data were analyzed with a Proc MIX procedure of SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Analysis of differences in Ab responses to GP5 in sera before and after challenge was performed with a Kruskal-Wallis test with Bonferroni adjustment. The other data were analyzed by ANOVA with Tukey adjustment.

### 3.4 Results

#### 3.4.1 Expression of recombinant adenoviruses (rAdV)

Expression of proteins was detected by Western blot 24 h after infection of A549 cells with rAdV expressing GFP, M-GP5 or M-GP5m. As shown in Figure 3.1, GFP as well as M-GP5 and M-GP5m fusion proteins were expressed at the expected 27, 41.4 and 42.6 kDa molecular weights, respectively (lanes 2 to 4). E1A gene expression was confirmed in rAdV-infected cells, indicating the capability of rAdV to replicate in non trans-complementing cells.



**Figure 3.1:** Expression of recombinant adenoviruses (rAdV) *in vitro*.

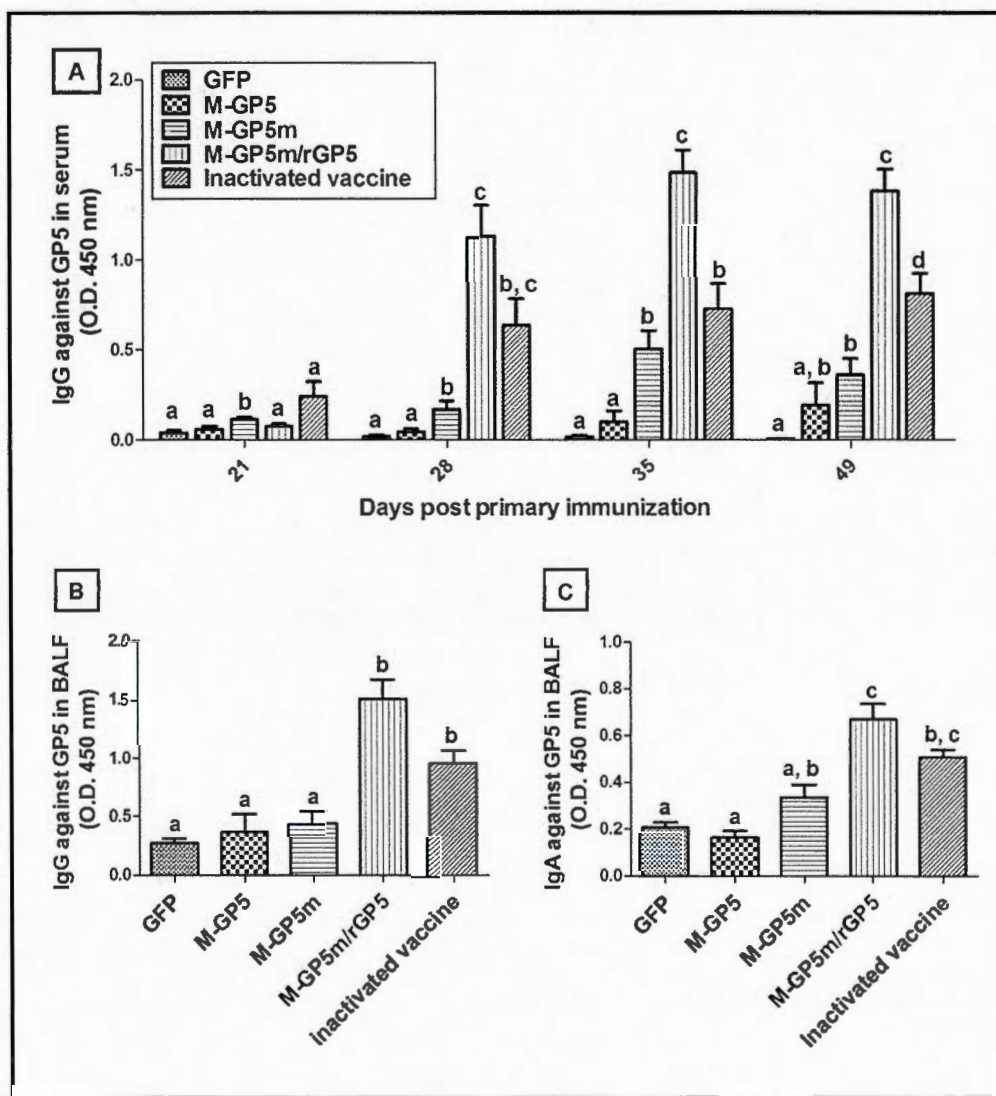
Western blot analysis of A549 cell lysates from mock infected (lane 1) or infected with rAdV (MOI of 1) expressing GFP (lane 2), M-GP5 (lane 3) and M-GP5m (lane 4). Immunoblot was performed using GFP-specific mouse monoclonal antibody or a convalescent PRRSV-specific pig antiserum as primary antibody and an anti-mouse or anti-pig IgG-HRP as secondary antibody. Replication capability of rAdV was confirmed by E1A expression (lanes 2–4). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) immunostaining was used as a loading control.



### 3.4.2 Antibody (Ab) response in immunized pigs

As shown in Figure 3.2A, serum GP5-specific Abs were detected from 28 dpi in pigs immunized twice with M-GP5m-expressing rAdV (M-GP5m group), and to a much higher level in pigs immunized with either rAdV expressing M-GP5m followed by a boost with rGP5 (M-GP5m/rGP5 group) or twice with the inactivated vaccine. Significantly higher Ab response was observed in the M-GP5m/rGP5 group of pigs at 35 and 49 dpi when compared to the other groups of immunized pigs ( $P < 0.005$ ). The M-GP5m group generated a better Ab response than that of the M-GP5 group at 28 ( $P < 0.01$ ) and 35 dpi ( $P < 0.005$ ). The M-GP5 group indeed showed the weakest Ab response among all groups of immunized pigs at any time point. There was no difference between the M-GP5m and inactivated vaccine groups at 28 and 35 dpi. In contrast, the Ab response observed in the inactivated vaccine group was higher ( $P < 0.005$ ) than that of the M-GP5m group at 49 dpi.

The presence of GP5-specific IgG and IgA in BALF from 8 pigs of each experimental group was determined by indirect ELISA at 49 dpi (Figure 3.2B and C). The M-GP5m/rGP5 group developed higher GP5-specific IgG and IgA responses than the M-GP5 and M-GP5m groups ( $P < 0.005$ ), being consistent with the serum results. However, the Ab response in the M-GP5m/rGP5 group was similar to that observed in pigs of the inactivated vaccine group. As observed with the serum results, pigs of the M-GP5 group showed the lowest GP5-specific Ab response in BALF. The presence of NAb was not detected in sera or BALF of any of the immunized pigs, regardless of the immunization regime. Finally, it is noteworthy that pigs immunized with rGP5 did not develop Ab against GST at any time point of the experiment (data not shown).

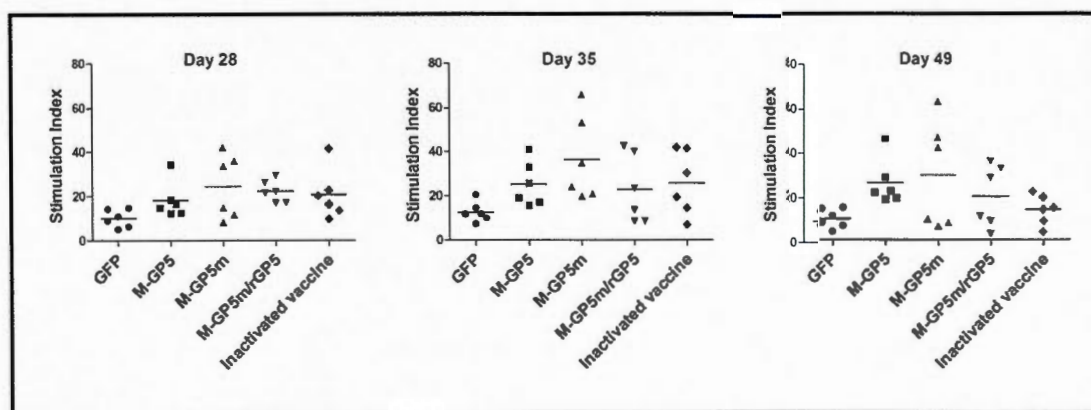


**Figure 3.2:** Antibody responses in pigs vaccinated with the recombinant adenoviruses.

(A) IgG specific to GP5 were detected in serum samples of pigs ( $n = 14$  per group) at various time points by indirect ELISA. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of pigs were collected at 49 days post primary immunization and IgG (B) or IgAs (C) specific to GP5 were determined by indirect ELISA ( $n = 8$  per group). Data are expressed as the mean + SEM. When two sets of data are labeled with superscripts of different letters, it indicates that these sets of data are statistically different ( $P < 0.01$ ) for (A) or ( $P < 0.05$ ) for (B) and (C).

### 3.4.3 Cellular immune response in pigs following immunization

The cell immune responses of six pigs per group that were used for experimental challenge were evaluated at 28, 35 and 49 dpi. As shown in Figure 3.3, no significant differences between the animal groups were observed due to the high variability in the cellular immune response obtained in individual pigs. Nonetheless, the SI mean in pigs of the M-GP5m group was higher than that obtained in the other groups at any time point following immunization.



**Figure 3.3: Lymphocyte proliferative responses in pigs immunized with recombinant adenoviruses.**

Peripheral blood mononuclear cells in quadruplicate were stimulated with inactivated PRRSV (MOI of 200) during 72 h. Cells were labeled with radioactive  $H^3$ -thymidine incorporated DNA 18 h before cell harvesting. The data are expressed as stimulation index (SI) which represents the ratio of mean CPM of cells stimulated with the antigen divided by the mean of CPM of cells without antigen. Data represent the individual responses of each pig and the means of the group ( $n = 6$  per group) at 28, 35 and 49 days post-immunization are represented by the horizontal bars.

### 3.4.4 Protective efficiency against PRRSV challenge

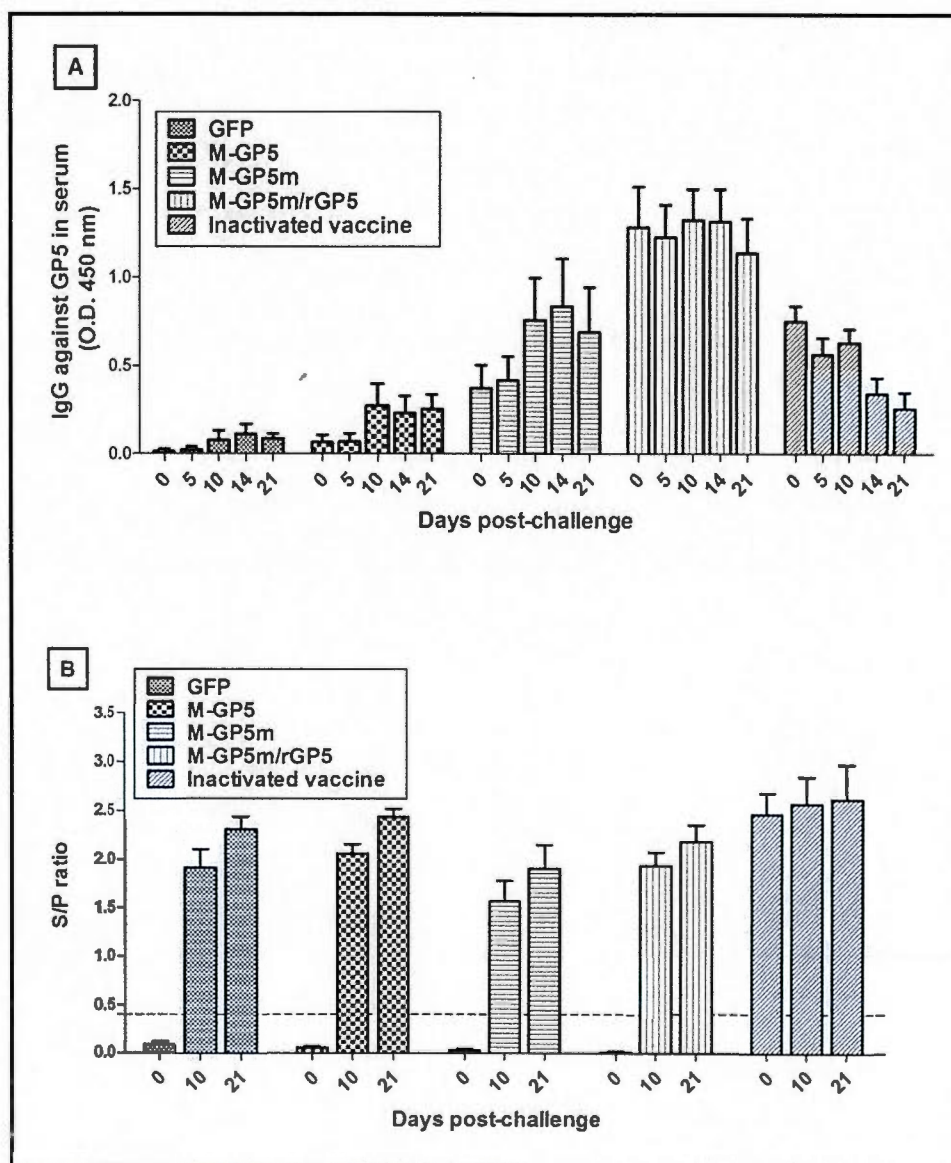
#### 3.4.4.1 Pathological signs and macroscopic lung lesions

One pig in the M-GP5m group suffered from posterior ataxia and was euthanized at 10 dpc. This animal was thus not considered in the challenge study. No clinical signs such as diarrhea, inappetence, cough or dyspnea were observed in any of the pigs throughout the experimental period of 21 dpc. The body temperature increased slightly at 3 dpc in all pigs but no other change was observed throughout the 21 dpc period. In addition, there was no difference in the average daily body weight gain among all groups of pigs. Percentages of macroscopic lung lesions were evaluated at 21 dpc. Pigs of the inactivated vaccine group showed the lowest macroscopic lung lesions (less than 1% in all pigs but one). There was no noticeable difference among all other groups of pigs regardless of the immunization regime with macroscopic lung lesions less than 5% (data not shown).

#### 3.4.4.2 Antibody (Ab) response after experimental challenge

The results of serum GP5-specific Ab response after challenge are presented in Figure 3.4A. The GFP, M-GP5 and M-GP5m groups of pigs showed an increase, although not significant, in GP5-specific Abs at 10 dpc. The M-GP5m/rGP5 animal group had the same level of GP5-specific Abs before and after challenge whereas in the inactivated vaccine group there was a significant diminution of Ab level between 0 and 21 dpc ( $P < 0.05$ ). As illustrated in Figure 3.4B, the level of serum Abs specific to PRRSV was also determined at 0, 10 and 21 dpc by the IDEXX ELISA. This ELISA detects Abs mainly specific to the PRRSV N protein (Brown et al., 2009; Cai et al., 2009). Pigs that had not received the inactivated vaccine developed N protein-specific Abs from 10 dpc with no differences in these Ab levels between groups. As expected, pigs of the inactivated vaccine group showed a high level of anti-N Abs at 0 dpc.





**Figure 3.4: Antibody responses in pigs sera challenged with the PRRSV FMV09-1155278 strain.**

(A) IgG specific to GP5 were detected in serum samples of pigs at various time points after challenge by indirect ELISA. Data are expressed as mean + SEM. (B) Kinetics of the IgG specific to PRRSV determined by HerdChek PRRS X3 ELISA are shown. Data are expressed in S/P ratio average. S/P ratio > 0.4 were considered positive ( $n = 6$  pigs for all groups but the M-GP5m group with 5 pigs).

As shown in Table 3.1, virus seroneutralization assays performed with the PRRSV IAF-Klop strain at 21 dpc indicate that all pigs of the inactivated vaccine group developed NABs with a titer of 16 in 50% of the pigs. Two pigs in the M-GP5m/rGP5 group developed NABs with titers of 2 and 4, respectively. No pigs from all other animal groups developed NAB response. When the assays were conducted with the FMV09-1155278 strain only pigs of the inactivated group developed NABs at titers comparable to those obtained with the IAF-Klop strain (data not shown).

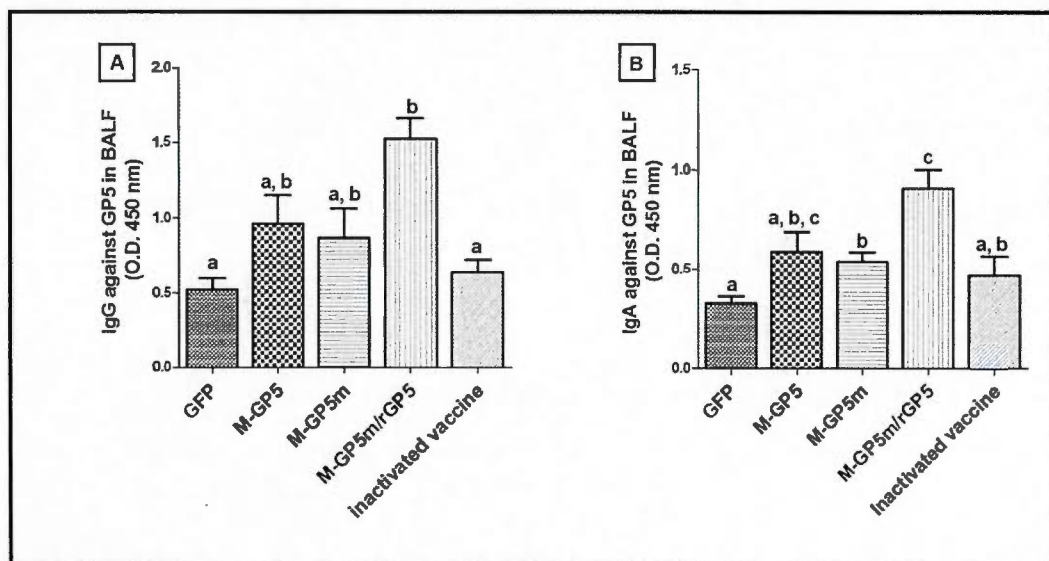
**Tableau 3.1: PRRSV specific neutralizing antibody titers in pigs at 21 day post challenge**

Group	< 2 <sup>a</sup>	2	4	8	16
GFP	6 <sup>b</sup>	0	0	0	0
M-GP5	6	0	0	0	0
M-GP5m	5	0	0	0	0
M-GP5m/rGP5	4	1	1	0	0
Inactivated vaccine	0	0	2	1	3

<sup>a</sup> Neutralizing antibody titer against the PRRSV IAF-Klop strain.

<sup>b</sup> Number of pigs.

The presence of GP5-specific IgG and IgA in BALF was determined at 21 dpc (Figure 3.5A and B, respectively). Pigs of the M-GP5m/rGP5 group developed higher ( $P < 0.0001$ ) GP5-specific IgG response than animals of the GFP and inactivated vaccine groups. This response was slightly better but not significantly different from that observed in the M-GP5 and M-GP5m groups of pigs. There was also no significant difference in the GP5-specific IgG level between the GFP, M-GP5, M-GP5m and the inactivated vaccine pig groups. However GP5-specific IgA level produced in pigs of the M-GP5m/rGP5 group was significantly higher than that observed in all other groups of animals ( $P < 0.05$ ) except the M-GP5 group. None of the pigs developed NABs in BALF following PRRSV challenge.



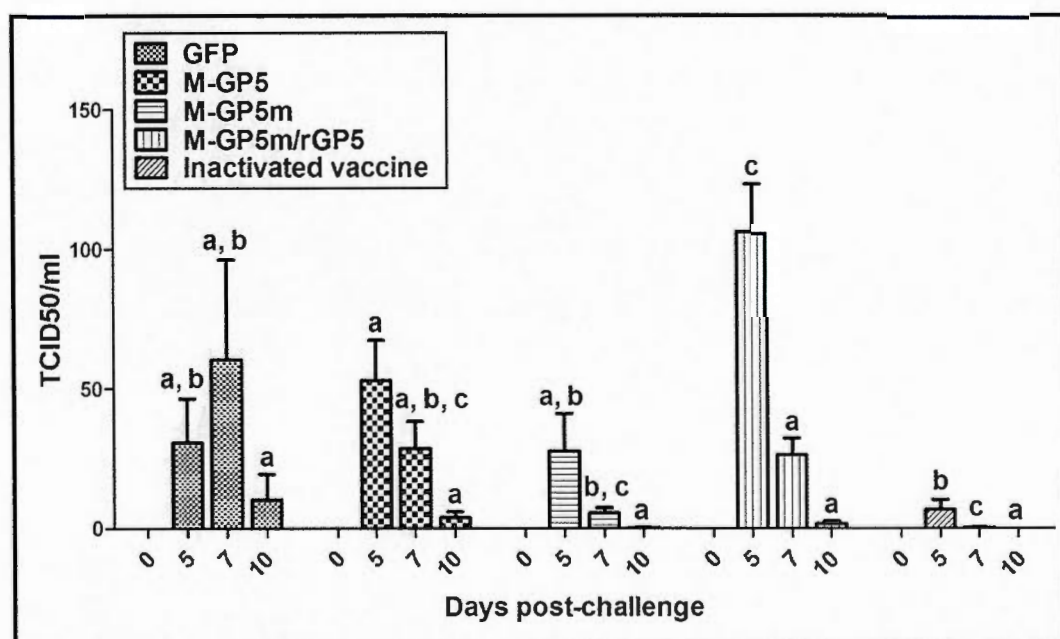
**Figure 3.5:** Antibody responses in bronchoalveolar lavage fluids of pigs challenged with the PRRSV FMV09-1155278 strain.

Indirect ELISA was performed to detect IgG (A) and IgA (B) specific to GP5 of pigs at day 21 post-challenge. Data are expressed as the mean + SEM ( $n = 6$  pigs for all groups but the M-GP5m group with 5 pigs). When 2 sets of data are labeled with superscripts of different letters, it indicates that these sets of data are statistically different ( $P < 0.05$ ).

### 3.4.5 Viremia

Viremia was monitored in sera of pigs at 0, 5, 7 and 10 dpc (Figure 3.6). The viremia level of the GFP group increased between 5 and 7 dpc, and was still detectable at 10 dpc (with a mean of 10.36 in TCID<sub>50</sub>/mL). The mean level of viremia of the M-GP5 group was not different when compared to the GFP group at 5 dpc, but decreased from 5 dpc to a mean level of 3.86 TCID<sub>50</sub>/mL at 10 dpc. The viremia level in pigs of the M-GP5m group at 5 dpc was somewhat lower than that of the GFP and M-GP5 groups and thereafter decreased to nearly undetectable levels at 10 dpc (mean of 0.20 TCID<sub>50</sub>/mL). Pigs of the inactivated vaccine group showed the lowest viremia levels among pigs of all other groups. The viremia level was almost undetectable at 7 dpc (mean of 0.21 TCID<sub>50</sub>/mL) and undetectable at 10 dpc. In contrast, pigs of the M-

GP5m/rGP5 group showed the highest viremia level (mean of 106.42 TCID<sub>50</sub>/mL) at 5 dpc when compared to that of all other animal groups at 5 dpc ( $P < 0.05$ ). The viremia level in the M-GP5m/rGP5 group decreased at 7 dpc but still was higher than those of pigs of the M-GP5m and inactivated vaccine groups ( $P < 0.05$ ). Viremia in this group was still detectable with a mean of 1.72 TCID<sub>50</sub>/mL at 10 dpc.



**Figure 3.6: Viremia of pigs immunized with recombinant adenoviruses and challenged with the PRRSV FMV09-1155278 strain.**

Pigs were challenged intranasally with  $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of PRRSV FMV09-1155278 strain at day 49 post primary immunization. The PRRSV loads were determined at 0, 5, 7 and 10 days post-challenge by quantitative real-time RT-PCR and expressed as TCID<sub>50</sub>/mL. Data are expressed as the mean + SEM ( $n = 6$  pigs for all groups but the M-GP5m group with 5 pigs). When 2 sets of data are labeled with superscripts of different letters at the same sampling day, it indicates that these sets of data are statistically different ( $P < 0.05$ ).

### 3.5 Discussion

In this study, replicating but nondisseminating human adenoviruses serotype 5 were used to express PRRSV proteins within the pig allowing induction of a PRRSV-



specific immune response. Pigs immunized with rAdV expressing M-GP5m show higher systemic and mucosal GP5-specific Ab responses than those of the M-GP5 group using an ELISA. Theoretically, mutations in GP5m were expected to generate a better NAb response than the use of WT GP5. The first mutation introduced in GP5m abolishes the decoy epitope to which a robust non NAb response has been associated (Ostrowski et al., 2002). Moreover, abolishing the N30 glycosylation site through the same mutation was also expected to generate a better NAb response (Jiang et al., 2007b). Insertion of the PADRE sequence between the decoy and neutralizing epitopes was also expected to generate better NAb and T-cell responses as reported elsewhere (Fang et al., 2006; Jiang et al., 2009). Finally abrogation of the N51 glycosylation site was also expected to enhance NAb production (Ansari et al., 2006b; Vu et al., 2011). Similarly to pigs of the M-GP5 group, NAbs were not detected in pigs of the M-GP5m group, nor during the immunization phase nor following PRRSV experimental challenge. This result was in contrast with that reported by Li et al. where immunization of pigs with a plasmid vector expressing a GP5 protein with similar mutations e.g. insertion of the PADRE sequence and abrogation of the N30 and N51 glycosylation sites resulted in significant and higher NAb response than that observed in animals immunized with a native form of GP5 (Li et al., 2009a). Although no NAbs were detected, a decrease in serum viral load with no complete elimination of the virus was observed in challenged pigs of both the M-GP5 and M-GP5m groups at 7 and 10 dpc when compared to the control GFP group. This decrease in virus load might be due to higher mean SI in both of these groups when compared to the mean SI of all other pig groups before challenge (Figure 3.6). The virus load decrease was even more pronounced in pigs of the M-GP5m group which showed the highest mean SI at any time point before challenge. These results might indicate a role of the cellular immune response in virus clearance as suggested elsewhere (Batista et al., 2004; Lopez Fuertes et al., 1999; Lowe et al., 2005). However, caution must be made with this interpretation as pigs of the

inactivated vaccine group showed the lowest viremia levels and SI values in this study.

Pigs of the M-GP5m/rGP5 group showed the highest Ab response among all experimental animal groups. This strong response was observed from one week (e.g. at 28 dpi) following inoculation with rGP5. This was likely due to the prime-boost regimen used since single inoculation of animals with rGP5 generated an Ab response only from day 14 after immunization and yet at a much lower level than that in pigs of the M-GP5m/rGP5 group (data not shown). However, pigs of the M-GP5m/rGP5 group showed, following challenge, higher viremia levels than the control group, indicating that the high Ab level generated in these pigs did not provide protection whatsoever but instead appeared to increase viremia. This increase in viral load can be explained by the antibody-dependent enhancement (ADE) mechanism by which non NAb mediate the attachment of PRRSV to monocyte/macrophage target cells via the Ab Fc receptor at the surface of these cells, resulting in cell internalization of the virus, and thereof, increased virus replication (Tirado et Yoon, 2003). Indeed, the ADE mechanism was suggested to be associated with PRRSV GP5 decoy epitope and N protein (Cancel-Tirado et al., 2004; Pirzadeh et Dea, 1998; Yoon et al., 1996). Further studies are needed to determine whether the use of rGP5 devoid of a functional decoy epitope would impact the presumably-ADE associated viremia level in immunized pigs following experimental challenge with PRRSV.

Animals of the inactivated vaccine group developed systemic and mucosal Ab responses. These immune responses were higher, albeit to non significant levels, than the M-GP5m during the immunization phase. IgA and IgG were detected in the lung lavage of animals of the inactivated vaccine group that were immunized through the systemic IM route in contrast to animals of the M-GP5m group that were vaccinated by both the mucosal (IN) and systemic (IM) routes. The presence of Ab in the lung lavage of pigs of the inactivated vaccine group is likely due to the passage of serum Ab through the lung mucous membranes by passive transudation (Belyakov et Ahlers,

2009). Whatever the mechanism is, all pigs of this group developed significant amounts of serum NAb after challenge and showed the lowest percentages of gross lesions and viral load when compared to pigs of all other groups. Although the role of NAb for in vivo protection against PRRSV is still a debate (Murtaugh et Genzow, 2011), a minimal serum NAb titer of 8 comparable to what was obtained in our pigs was reported to be necessary to prevent viremia (Lopez et al., 2007; Osorio et al., 2002).

In this study, pigs were challenged with a virus strain heterologous to that used for the immunization phase due to our difficulty in reproducing clinical disease and viremia with the IAF-Klop strain. Thus the FMV09-1155278 PRRSV strain that was recently isolated in Québec was used for experimental challenge. Moreover the utilization of a heterologous virus strain for challenge was of interest as it is well known that PRRSV antigenic variation occurs under field conditions (Goldberg et al., 2003). It is noteworthy that the PRRSV FMV09-1155278 strain has the same GP5 neutralizing epitope sequence (SHLQ**LI**YNL) as the VR2332 strain-based PRRSV MLV commercial vaccine used in this study in an inactivated form. This sequence differs by two aa (in bold and underlined) when compared to the IAF-Klop neutralizing epitope (S**Q**LQ**SI**YNL). Thus, NAb titers were expected to be higher in pigs of the inactivated vaccine group using a homologous viral strain in the virus seroneutralization test. However, the fact that comparable NAb titer results were obtained in pigs of the latter group using either PRRSV IAF-Klop or FMV09-1155278 strain in the assay might suggest that these aa are not critical for the GP5 neutralizing epitope. Alternately, the results may reflect different susceptibility of the virus strains to in vitro neutralization (Martinez-Lobo et al., 2011).

No clinical signs were observed in the virus-exposed pigs including control animals indicating that the PRRSV FMV09-1155278 strain used for challenge was attenuated. This might be attributed to the serial passage of the virus on MARC145 cells. Despite the absence of clinical signs, a viremia state, a parameter used in other studies to ascertain protection in immunized pigs with or without overt clinical signs

following challenge (Hou et al., 2008; Jiang et al., 2007c; Martelli et al., 2007), was observed in all control animals at 5 dpc. In addition, pigs of all groups developed an Ab response specific to the PRRSV N protein at 10 dpc indicating productive infection in these animals.

In summary replicating but nondisseminating adenoviruses expressing M-GP5 or M-GP5m conferred partial protection against PRRSV. The degree of immune protection was better in the case of M-GP5m expression. Our data were consistent with those of other vector-based vaccination strategies proposed to date that have generated only partial protection of animals.

### **3.6 Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, strategic program), Agriculture and Agri-Food Canada (AAC), the “Conseil pour le Développement de l’Agriculture du Québec” (CDAQ), the “Fédération des Producteurs de Porcs du Québec” (FPPQ), and “les Conseils d’Adaptation du porc de l’Alberta, du Manitoba et de la Saskatchewan”. E. Roques was supported by graduate student fellowships from the “Centre de Recherche en Infectiologie Porcine” (CRIP) and “La Fondation UQAM”. The authors thank Frédéric Beaudoin, Nedzad Music, Philippe Cournoyer, Wilfried Saron, Fernando Alvarez, Andrea Gomez, Sabrina Peiro for technical assistance and/or helpful discussion, Steve Méthot for statistical analyses of the data and all employees in taking care of animals during the project.



## **CHAPITRE IV**

### **ANTIBODY RESPONSES INDUCED IN MICE IMMUNIZED WITH RECOMBINANT ADENOVECTORS EXPRESSING CHIMERIC PROTEINS OF VARIOUS PORCINE PATHOGENS**

Elodie Roques<sup>1</sup>, Aurélie Girard<sup>1</sup>, Carl A. Gagnon<sup>2</sup> and Denis Archambault<sup>1</sup>

#### **Affiliations:**

<sup>1</sup> University of Québec at Montréal, Department of Biological Sciences, P.O. Box 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada.

<sup>2</sup> Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (CRIP), Faculty of Veterinary Medicine, University of Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada.

#### **Contribution des auteurs:**

Ce chapitre présenté sous forme d'article scientifique est acceptable avec corrections mineures pour publication dans la revue *Vaccine*. La réalisation et l'analyse des expériences ont été faites par l'auteur de cette thèse. La rédaction du manuscrit ainsi que le montage des figures ont été réalisées par l'auteur de cette thèse. Aurélie Girard a été impliquée dans les essais d'immunisation chez la souris. Le Docteur Carl Gagnon a apporté son expertise au projet. Le Docteur Denis Archambault a conçu et élaboré la stratégie de vaccination, supervisé le projet et corrigé le manuscrit. Tous les auteurs ont discuté des résultats, révisé et approuvé le manuscrit final. Les références de cet article se retrouvent à la fin du manuscrit.

#### 4.1 Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), Porcine Circovirus type 2 (PCV2) and *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* are swine pathogens of economic importance. Although vaccines are available for each pathogen, no commercial bivalent vaccines have been developed so far. In this study, recombinant adenovectors (AdVs) expressing proteins of each pathogen were developed and their immunogenicity tested in mice. The proteins of interest were the glycoprotein GP5 of PRRSV, the capsid (Cap) protein of PCV2b and the C-terminal portion of P97 (P97c) protein of *M. hyopneumoniae* that were used alone and/or in fusion with each other. Inoculation of mice with the AdVs resulted in antibody (Ab) responses specific to the immunogens. Unexpectedly, immunization with vaccines expressing P97c in fusion to either Cap or GP5 enhanced the Ab responses against Cap and GP5, suggesting an immunopotentiator effect for P97c.

**Keywords:** PRRSV GP5, PCV2 Cap, *Mycoplasma hyopneumoniae* P97, adenovectors, antibody response, immunopotentialiation

## 4.2 Introduction

Reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is one of the most important etiological viral agent in swine industry (Holtkamp et al., 2012; Neumann et al., 2005). The PRRSV-associated disease is characterized by severe respiratory clinical signs in pigs of all ages and reproductive disorders in sows (Rossow, 1998). The genome of PRRSV, an arterivirus (Snijder et Meulenberg, 1998), is a positive, single-stranded, mRNA molecule that contained nine open reading frames (ORFs) that encode several proteins, including GP5 and M structural proteins (Music et Gagnon, 2010). GP5 (25 kDa) is a glycosylated envelope protein that carries the major neutralizing epitope (Ostrowski et al., 2002). M (19 kDa) is a non-glycosylated membrane protein linked to GP5 via disulfide bonds (Mardassi et al., 1996). M induces a robust cellular immune response in a PRRSV-exposed host (Bautista et al., 1999). Attenuated or whole virus-inactivated vaccines are commercially available against PRRSV. However, these vaccines are hampered by a risk of reversion to virulence for the former (Madsen et al., 1998) and may not confer optimal protection for the latter (Scortti et al., 2007). Therefore several vaccine strategies targeting GP5 have been developed. However, all these strategies have failed to confer optimal protection against PRRSV (Cruz et al., 2010).

The porcine circovirus type 2 (PCV2), another porcine pathogen, is the causative agent of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and other pathologies grouped under the acronym PCVAD (porcine circovirus type 2-associated diseases) (Gillespie et al., 2009). Cofactors are often involved in the severity of PCVAD, including coinfection with PRRSV and *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* (Ramamoorthy et Meng, 2009). PCV2 genome is composed of a small circular single-stranded DNA of about 1.8 kb in length that contains two ORFs encoding the replicase and capsid (Cap) proteins, respectively, the latter protein being involved in protection against PCV2 (Finsterbusch et Mankertz, 2009). Commercial

vaccines to prevent PCV2 infection have proven efficacy under field conditions (Fachinger et al., 2008; Horlen et al., 2008).

Another important porcine pathogen is *M. hyopneumoniae*, the etiological agent of enzootic pneumonia. *M. hyopneumoniae* genome is composed of a circular double-stranded DNA of about 900 kb in length (Minion et al., 2004). Among proteins identified so far is P97 which plays a major role in the pathogen binding to the swine epithelia cells to initiate infection (Hsu et al., 1997). P97 (97 kDa) is composed of two repeat regions, R1 and R2, that are localized in the C-terminal portion of the protein (Hsu et Minion, 1998a). The commercial bacterin-based vaccines against *M. hyopneumoniae* significantly decrease the clinical symptoms. However, they do not completely eliminate tissue colonization of the pathogen (Chae, 2011).

PRRSV, PCV2 and *M. hyopneumoniae* can be involved in a clinical entity termed porcine respiratory disease complex (PRDC) (Hansen et al., 2010; Thacker, 2001). Coinfection with one or the other of these pathogens increases the duration and severity of PRDC (Opriessnig et al., 2004; Sinha et al., 2011; Thacker et al., 1999). In this study, recombinant adenovectors (AdVs) expressing fusion proteins composed of the C-terminal region of P97 (P97c) and PRRSV GP5 (P97c-GP5), P97c and PCV2b Cap (P97c-Cap), or PRRSV GP5 and PCV2b Cap (GP5-Cap) were generated in attempts to develop bivalent vaccines. Specific antibody (Ab) responses of mice given the AdVs were generated to the P97c, GP5 and Cap immunogens. Unexpectedly, fusion of GP5 or Cap with P97c enhanced the GP5 or Cap-specific Ab responses, suggesting an immunopentiator effect for P97c.



### 4.3 Material and methods

#### 4.3.1 Viruses, cells and synthetic genes

The PRRSV IAF-Klop (Gagnon et al., 2003) and PCV2b FMV-06-1717 strains (Gagnon et al., 2008) were propagated and titrated in MARC-145 (Kheyyar et al., 2005) or PK15A cells, respectively. The AD-293 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and A549 cell lines were propagated as for the MARC-145 cells. The AdVs were propagated and titrated in AD-293 cells whereas A549 cells were used to confirm protein expression from the AdVs (Oualikene et al., 2000).

The codons most frequently used in *Sus scrofa* cells were used to generate synthetic genes (GeneArt services, Invitrogen) encoding the PRRSV (IAF Klop strain) GP5 and M proteins (Genbank accession #U64928), the PCV2b (FMV-06-1717 strain) Cap protein (Gagnon et al., 2008) or the P97c protein [C-terminal 311 amino acids (aa)] of *M. hyopneumoniae* 232 strain (Genbank accession #U50901.1).

#### 4.3.2 Gene fusion and construction of AdVs

The genes of interest were amplified by PCR and cloned into pBluescript KS(+) (Stratagene, La Jolla, CA). A linker sequence (GTTACCACC) was inserted between the encoding sequences to generate the fused genes (Jiang et al., 2006a). The ORF encoding P97c, Cap, M-GP5, Cap-GP5, P97c-GP5, P97c-Cap or Cap-P97c were validated by DNA sequencing (McGill University Sequencing Services, Montréal, Canada).

The AdV used in this study was a replicative-defective E1- and E3-deleted human adenovirus serotype 5. The pBluescript KS(+) plasmids containing the amplicons were digested with *BglIII/XhoI*. Amplicons were cloned into the pShuttle-IRES-hrGFP-1 transfer vector and the pAdEasy-1 vector was used to generate the AdVs according to the manufacturer's protocol (AdEasy Adenoviral Vector System; Agilent Technologies). AdVs were produced at a large scale and purified (Bourbeau

et al., 2007). The infectious dose of AdVs was determined in AD-293-infected cells and titers were expressed in tissue culture infectious dose 50 per ml (TCID<sub>50</sub>/ml) (Karber, 1931).

#### 4.3.3 Western blot assay

For each sample, 50 µg of total cell extract prepared as described (Gomez Corredor et Archambault, 2009) were fractionated onto 12% SDS-polyacrylamide gels, electroblotted onto a nitrocellulose membrane and probed with convalescent pig antisera specific to either PRRSV (1/5,000) (Gonin et al., 1999) or PCV2b (1/10,000) or with mouse monoclonal anti-P97c (MAb 8H4-G6) (1/1,000) (Okamba et al., 2007). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) immunostaining (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) was used as a loading control. Detection of the proteins was performed as previously described (Gomez Corredor et Archambault, 2012).

#### 4.3.4 Production of recombinant proteins

Plasmids pGEX-4T1 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) encoding PRRSV GP5 or *M. hyopneumoniae* P97 (aa 534-1093) have been described (Gonin et al., 1999; Okamba et al., 2007). The PCV2b Cap protein (lacking the 39 N-terminal aa (Zhou et al., 2005)) was cloned into pGEX-4T1. All recombinant proteins (rGP5, rP97c or rCap) were produced in BL21(DE3)pLysS competent *E. coli* cells (Promega, Madison, WI) upon induction at OD<sub>600nm</sub> of 1.2 with 0.1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside for 4h at 37°C. Bacterial cells were lysed by sonication in buffer (PBS, 0.5% Tween-20, 0.5% triton X-100, 0.5% NP40) and the whole bacteria protein extract was fractionated through 12% SDS-PAGE. The bands corresponding to the rGP5, rCap or rP97 expected molecular weights were excised from the gel and electroeluted. The proteins were dialyzed against PBS and their identity confirmed by Western blot as described above. These proteins were used in ELISA.

#### 4.3.5 Immunization of mice

Animal protocols were approved according to the regulations of the Canadian Council for Animal Care. Six-week-old female BALB/c mice were purchased from Charles River Laboratory (St-Constant, Canada). In a first experiment, mice were divided into 4 groups of 5 mice and immunized by the intramuscular route (IM) at days 0 and 14 with  $10^9$  TCID<sub>50</sub> of AdVs expressing green fluorescent protein (GFP; negative control), M-GP5, Cap-GP5 or P97c-GP5 fusion proteins. Blood samples for serum preparation were collected from the mandibular vein at 0, 14, 28 and 35 days post-immunization (dpi). At 49 dpi, blood was obtained from cardiac puncture in mice under anaesthesia with isoflurane.

In a second experiment, mice were divided into 5 groups of 6 mice and immunized IM at days 0 and 14 with  $10^9$  TCID<sub>50</sub> of AdVs expressing GFP, P97c, Cap, P97c-Cap or Cap-P97c. Blood samples for serum preparation were collected from the mandibular vein at 0, 14, 28, 35 and 49 dpi, and at 56 dpi from cardiac puncture.

#### 4.3.6 Antibody response

##### 4.3.6.1 Indirect ELISA

96-well Immulon 2HB ELISA plates (Thermo Labsystems, Franklin, MA) were coated overnight at 4°C with 0.1 µg of recombinant protein (rGP5, rCap or rP97) per well diluted in 0.05 M sodium carbonate buffer (pH 9.6). Following a blocking treatment with bovine serum albumin (BSA), Ab determination (in duplicate wells) was performed using 100 µl of mouse serum diluted to 1/100 (or 1/50 for IgG isotype determination) and an incubation time of 2h at 37°C. HRP-conjugated goat anti-mouse IgG1 (1/10,000), IgG2a (1/5,000), IgG2b (1/2,500) or IgG3 (1/500) (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) were added for 1h at 37°C. HRP signal was detected using the tetramethylbenzidine (TMB, Sigma-Aldrich) substrate. For each

serum sample, the optical density ( $OD_{450nm}$ ) was corrected by subtracting the OD of uncoated wells from that of antigen-coated wells.

#### 4.3.6.2 Virus-specific neutralization assay (NT)

Two-fold serial dilutions of each serum sample (inactivated for 30 min at 56°C) were done in cell culture medium. The PRRSV-specific NT was performed by a viral cytopathic effect inhibition method using four wells of indicator cells per serum dilution and an incubation time of 96h (Dea et al., 1996). The neutralizing Ab (NAb) titer was expressed as the reciprocal of the highest sample dilution neutralizing 100 TCID<sub>50</sub> of the virus. For the PCV2b-specific NT, 25 µl of serum two-fold serial dilutions was incubated with 25 µl of 100 TCID<sub>50</sub> of the virus for 1h at 37°C. The mixture was then transferred to PK15A cells plated in a 96-well plate (four wells per specimen dilution,  $8 \times 10^4$  cells/well). The inoculum was removed 1h later and 50 µl of fresh cell culture medium was added into each well. Cells were fixed in PBS-formaldehyde 4% after 96h, permeabilized with 1:1 acetone/methanol solution for 15 min at -20°C, and blocked with 5% BSA in PBS for 1h at 37°C. Cells were incubated with rabbit FITC-labeled anti-porcine secondary Ab (1/250) (MP Biomedicals) for 45 min at 37°C. Nuclei were counterstained with propidium iodide (Sigma-Aldrich). Images were taken using an inverse microscope (Nikon TE-300) coupled to the confocal Bio-Rad MRC-1024ES system, and analyzed with Image-J software. For each well, the number of PCV2b-infected cells was compared to that of PK15A cells inoculated with PCV2b exposed to serum from non-immunized mice (control). NAb titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution of the serum that inhibited more than 50% of PCV2b infection.



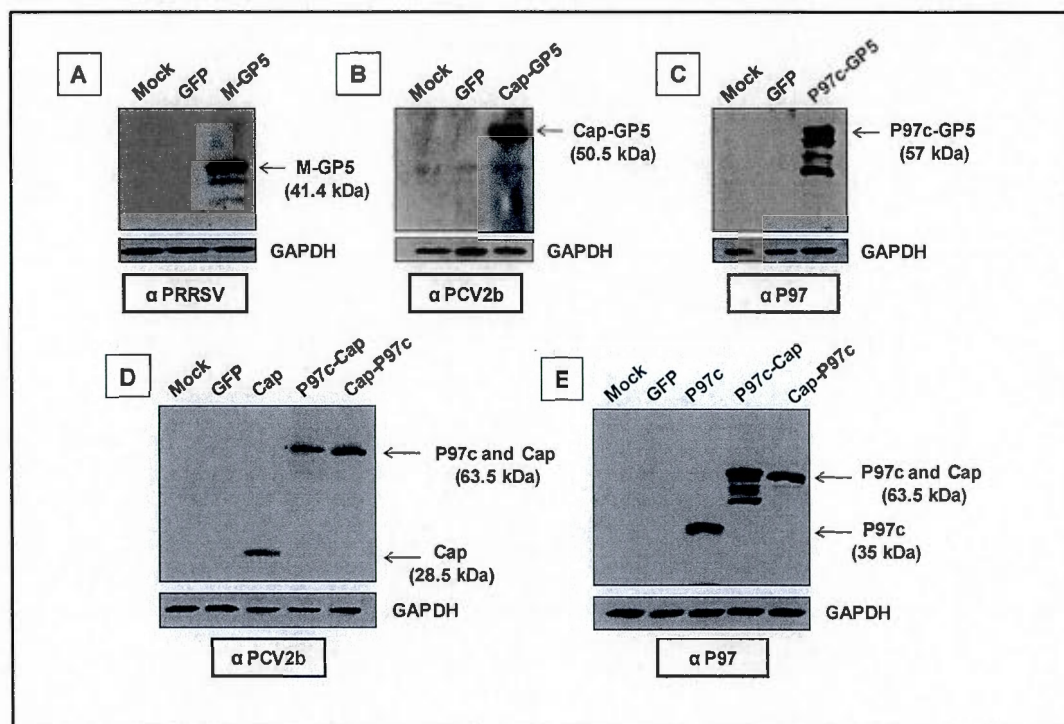
#### **4.3.7 Statistical analysis**

Where indicated, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test were carried out for statistical analyses between multiple groups using GraphPad Prism software (Windows Version 5.0, Lajolla, CA, USA).

### **4.4 Results**

#### **4.4.1 Expression of recombinant adenovectors**

Expression of proteins was detected by Western blot 24h after infection of A549 cells with the AdVs. As shown in Fig. 4.1, M-GP5 (Panel A), Cap-GP5 (Panel B), P97c-GP5 (Panel C), Cap (Panel D), P97c (Panel E), P97c-Cap and Cap-P97c (Panels D-E) proteins were expressed at the expected molecular weights. No immunoreactive bands were detected with extracts from uninfected control cells or from cells infected with AdVs expressing GFP.



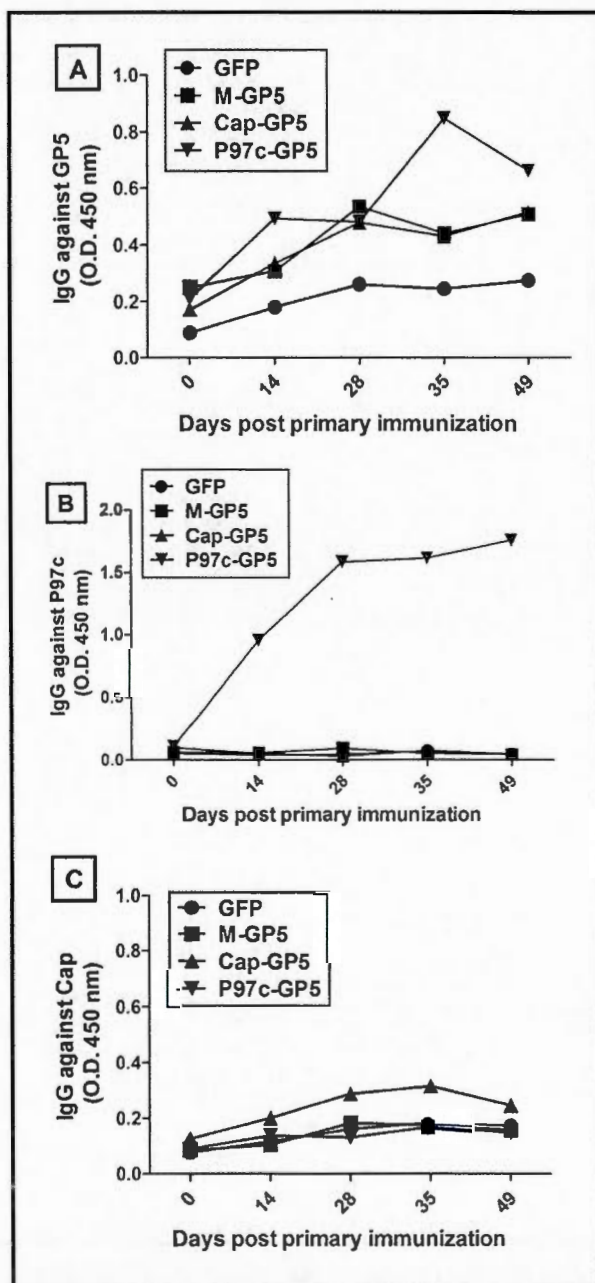
**Figure 4.1: Expression of recombinant adenovectors (AdVs) *in vitro*.**

Western blot analysis of A549 cells lysates from mock-infected or infected with AdVs (MOI of 10) expressing GFP, M-GP5 (A), Cap-GP5 (B), P97c-GP5 (C), Cap (D), P97c (E) or P97c and Cap (D-E). Immunoblot was performed using (A) a convalescent PRRSV-specific pig antiserum, (B, D) a convalescent PCV2b-specific pig antiserum, or (C, E) a mouse monoclonal anti-P97c as primary antibodies, and an anti-pig IgG-HRP (A, B, D) or anti-mouse IgG-HRP (C, E) as secondary antibodies. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, 37 kDa) immunostaining was used as a loading control.

#### 4.4.2 Ab responses in mice immunized with AdVs expressing GP5 in fusion with various protein partners

In a first experiment, the ability of AdVs expressing Cap-GP5 or P97c-GP5 fusion proteins to induce GP5-specific Abs in mice was compared to that of AdVs expressing PRRSV M-GP5. The latter group of mice was included because expression of the M-GP5 fusion protein from AdVs induces a higher GP5-specific Ab response when compared to that of GP5 alone (Jiang et al., 2006a; Zheng et al., 2007).

All groups of mice produced GP5-specific Abs from 14 dpi (Fig. 4.2A). The highest Ab level was obtained in mice of the P97c-GP5 group at 14, 35 and 49 dpi whereas Ab levels between the M-GP5 and Cap-GP5 groups were similar at any time point of the experiment. No GP5-specific NAbs were detected in any groups of mice. P97c- and Cap-specific Ab responses were also determined in these groups of mice. Anti-P97c Abs were detected at 14 dpi in mice of the P97c-GP5 group with a peak level from 28 dpi (Fig. 4.2B). Mice of the Cap-GP5 group developed a low level of PCV2 Cap-specific Abs (Fig. 4.2C) even though PCV2-specific NAbs with a mean titer of 3.4 were detected at 49 dpi in mice of this group.



**Figure 4.2:** Antibody responses in mice vaccinated with the recombinant adenovectors (AdVs) expressing M-GP5, Cap-GP5 or P97c-GP5.

IgGs specific to GP5 (A), P97c (B) or Cap (C) were detected in serum samples of mice ( $n = 5$  per group) at various time points by indirect ELISA. Data are expressed as mean OD of three independent ELISA tests.

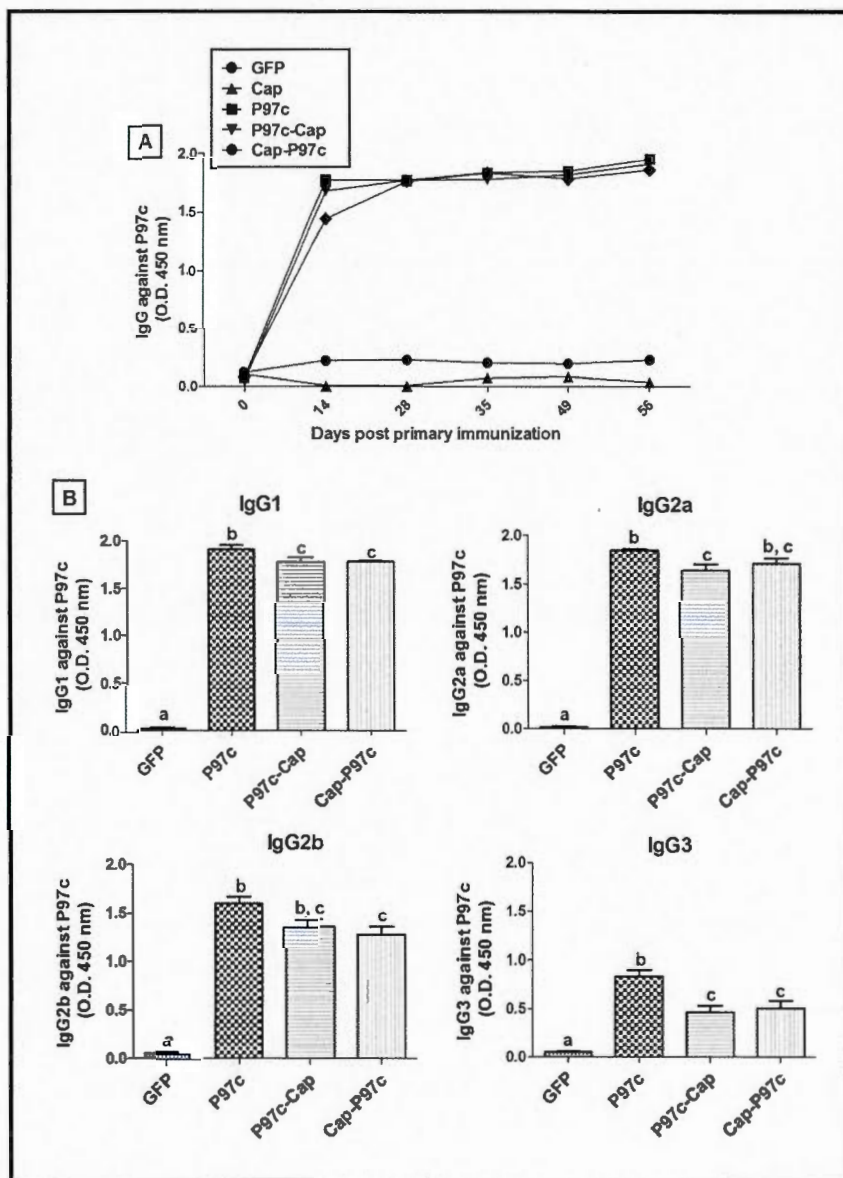


#### **4.4.3 The fusion protein orientation influences the Ab response in mice immunized with P97c and Cap proteins**

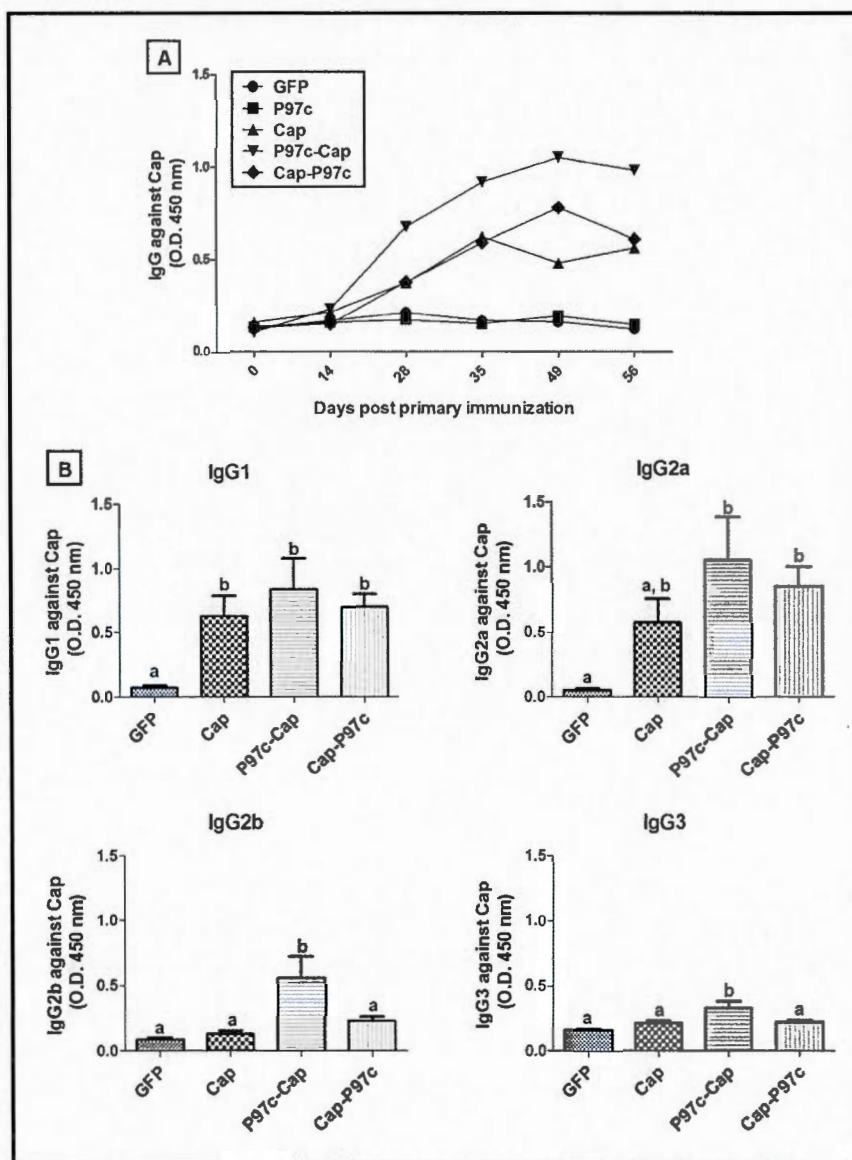
In light of the data obtained above showing an apparent immunopotentiator effect of P97c, we wished to confirm this result with another immunogen. We also wished to extend the study by determining the impact of the fusion protein orientation to generate Abs. Mice were thus immunized at days 0 and 14 with AdVs expressing P97c or Cap alone or in fusion in either orientation (P97c-Cap or Cap-P97c).

Mice given AdVs expressing P97c alone or in fusion with Cap in both orientations developed robust P97c-specific Ab response as determined by ELISA (Fig. 4.3A). The Ab response was maximal as early as 14 dpi, albeit to a slight lower level for the Cap-P97c group, and was maintained to this level at any time point thereafter for all groups of mice. IgG isotyping was realized at 56 dpi in order to analyze the immune response profile. As shown in Fig. 4.3B, mice of all immunized groups developed P97c-specific IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3. The Ab levels for each IgG isotype were quite similar among groups, although significantly higher mean OD values were noticeable for IgG1 and IgG3 isotypes in the P97c group.

Mice of all groups immunized with Cap developed PCV2 Cap-specific Abs from 28 dpi as determined by ELISA (Fig. 4.4A). Similarly to the results obtained for the PRRSV GP5 system, the highest Cap-specific Ab response was observed in mice given P97c-Cap fusion protein-expressing AdVs at any time point. Similar Ab levels were obtained in mice of the Cap and Cap-P97c groups throughout the experiment. Analysis of the isotyping profile showed that the Cap-specific IgG1 and IgG2a levels were quite similar between groups although the response tended to be higher in mice of the P97c-Cap group (Fig. 4.4B). Consistent with this, only mice of the P97c-Cap group showed significant levels of Cap-specific IgG2b and IgG3.

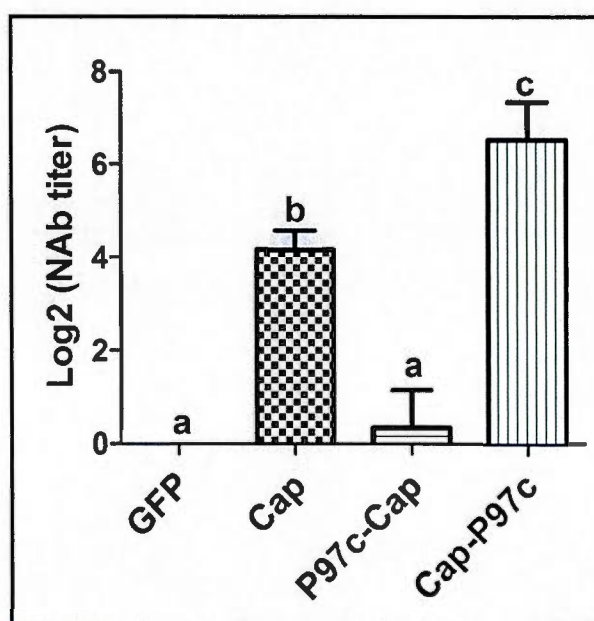


**Figure 4.3:** P97c-specific antibody responses in mice vaccinated with the recombinant adenovectors (AdVs) expressing P97c, Cap, P97c-Cap or Cap-P97c. (A) IgGs specific to P97c were detected in pooled serum samples of mice ( $n = 6$  per group) at various time points by indirect ELISA. Data are shown as mean of three independent ELISA tests. (B) Determination by indirect ELISA of serum P97c-specific IgGs isotypes in individual mice on day 56 post primary immunization. Data are expressed as mean OD + SEM. When 2 sets of data are labeled with superscripts of different letters, it indicates that these sets of data are statistically different ( $P < 0.05$ ).



**Figure 4.4: Cap-specific antibody responses in mice vaccinated with the recombinant adenovectors (AdVs) expressing P97c, Cap, P97c-Cap or Cap-P97c.** (A) IgG specific to Cap were detected in serum pooled samples of mice (n = 6 per group) at various time points by indirect ELISA. Data are expressed as mean of three independent ELISA tests. (B) Determination by indirect ELISA of serum Cap-specific IgGs isotypes in individual mice on day 56 post primary immunization. Data are shown as mean OD + SEM. When 2 sets of data are labeled with superscripts of different letters, it indicates that these sets of data are statistically different ( $P < 0.05$ ).

The PCV2-specific NT was performed to determine the NAb production at 56 dpi. Mice of the Cap-P97c group showed the highest NAb response ( $P < 0.001$ ) with a mean NAb titer of 6.5 as compared to the mean NAb titer of 4.16 from the group of mice given the Cap protein alone (Fig. 4.5). Only one mouse of the P97c-Cap developed a low level of PCV2-specific NABs with a resulting mean NAb titer of 0.33.



**Figure 4.5:** Serum neutralizing antibody response specific to PCV2b in mice immunized with the recombinant adenovectors (AdVs) expressing P97c, Cap, P97c-Cap or Cap-P97c.

Neutralizing antibodies were detected in serum samples of individual mice ( $n = 6$  per group) on day 56 post primary immunization. The neutralizing antibody (NAb) titers were calculated as the reciprocal of endpoint serum dilution that inhibits more than 50% of the PCV2b replication, and are expressed as  $\log_2$  mean titer + SD. When 2 sets of data are labeled with superscripts of different letters, it indicates that these sets of data are statistically different ( $P < 0.05$ ).



## 4.5 Discussion

All selected PRRSV, PCV2 and *M. hyopneumoniae* proteins were readily expressed from AdVs in A549 cells as determined by Western blot (Fig. 1). It is noteworthy that when P97c was fused at its C-terminal extremity to either GP5 or Cap, several bands of lower molecular weight were detected using the anti-P97 Ab (Fig. 1C and E). These bands were attributed to spontaneous cleavage of the fusion protein in line with a possible conformational change of the P97c that would render functional the cleavage sites present in its C-terminus (Djordjevic et al., 2004). In contrast, a sole band was detected when P97c was expressed alone or in fusion at its N-terminus (Fig. 1E). This result is similar to that reported elsewhere upon expression of P97 alone from AdVs (Okamba et al., 2007).

The AdVs were investigated for their ability to induce in mice Ab responses specific to the selected porcine pathogen proteins. In a first experiment, mice were inoculated with AdVs expressing GFP (control), Cap-GP5, P97c-GP5 or M-GP5 proteins. The latter fusion protein was used as a control immunogen because it induces higher GP5-specific Ab response than the use of GP5 alone (Jiang et al., 2006a; Zheng et al., 2007). Based on the M-GP5 fusion protein premise, we thus wished to analyze the Ab response obtained with GP5 fused to different protein partners in order to develop bivalent vaccines targeting PRRSV and other porcine pathogens. AdVs encoding GP5 fused to either M or Cap generate similar levels of GP5-specific Abs in inoculated mice (Fig. 2A). In contrast, the use of AdVs expressing GP5 fused to P97c increased GP5-specific Ab production, suggesting an adjuvant effect of P97c. Despite these Ab responses, PRRSV-specific NAbs were not detected in mice of any groups. This result is in agreement with reports showing the failure of inducing PRRSV-specific NAbs with the use of sub-unit or inactivated vaccines (Gagnon et al., 2003; Misinzo et al., 2006; Qiu et al., 2005).

In light of the apparent immunopotentiator effect of P97c, an additional experiment was undertaken using another immunogenic system. Mice were

immunized with AdVs expressing P97c, Cap, P97c-Cap or Cap-P97c. Mice of all groups given the P97c alone or in fusion with Cap developed robust P97c-specific Ab response after a single dose of AdVs. In addition, a mixed Th1/Th2 P97c-specific response was observed as shown by the production of P97c-specific IgG1 (typical of a Th1 response), and of IgG2a, IgG2b and IgG3 (typical of a Th2 response) (Mosmann et Coffman, 1989; Stevens et al., 1988), confirming the results of others (Okamba et al., 2007). The results also showed that fusion of P97c with Cap in either orientation did not impact the Ab response to P97c. In contrast, fusion orientation had a marked impact on Cap-specific Ab response. The best Ab response, as determined by ELISA, was obtained in mice of the P97c-Cap group while the response in mice of the Cap-P97c and Cap groups group were similar. These results were consistent with the fact that only mice immunized with P97c-Cap produced significant levels of Cap-specific IgG2b and IgG3 in addition to the production of IgG1 and IgG2b observed in mice of all groups immunized with Cap in either form. All together the results showed that P97c exerted immunopotentiator and modulatory effects on the Cap-specific immune response when fused at its C-terminal.

As NAb are important to prevent PCV2 viremia and PMWS development (Fort et al., 2007), the presence of PCV2-specific NAb was determined at 56 dpi. Mice inoculated with AdVs expressing Cap alone developed NAb with a mean titer of 4.16, a value that is similar to that reported in another study (Wang et al., 2006). Unexpectedly, and in contrast to the ELISA results, the highest NAb mean titer of 6.5 was obtained in mice of the Cap-P97c group whereas only one mouse of the P97c-Cap group developed a low NAb titer of 2. These discordant results suggest that ELISA Ab titers may be not relevant for evaluating vaccine efficacy. They also may refer to an interference state for the Cap neutralizing epitope accessibility to the immune system when P97c is fused at the N-terminus of Cap. Whatever the explanation is, P97c did immunopotentiate the PCV2-specific NAb response when fused at the C-terminus of Cap. This also enlightens the importance of thoroughly

analyzing an immunopotentiator candidate, the fusion protein orientation herein, to generate the desired immune response to an immunogen.

In conclusion, AdVs expressing PRRSV GP5, PCV2 Cap and *M. hyopneumoniae* P97c proteins induced the production of specific Abs in mice. Other experiments are needed to determine the immunogenicity and protective effect of these AdVs in the natural host (e.g. in the pig). We also showed that P97c enhanced Ab response induced by GP5 or Cap when fused to these proteins, indicating an immunopotentiator effect for P97c. Studies are currently underway to determine the mechanisms by which P97c modulates the immune system. Activation of the innate immune system by P97c is more likely at play since *M. hyopneumoniae* was shown to induce the production of pro-inflammatory cytokines in macrophages in vitro (Damte et al., 2011; Hwang et al., 2011; Muneta et al., 2003).

#### 4.6 Acknowledgements

This work was supported by “New initiatives” grants from the “Centre de Recherche en Infectiologie Porcine” (CRIP). E. Roques was supported by a graduate student fellowship from the CRIP and “La Fondation UQAM”. The authors thank Marie-Claude St-Louis, Nedzad Music, Wilfried Saron, and Andrea Gomez for technical assistance and/or helpful discussion. We also thank Denis Flipo for confocal microscopy analysis and all employees in taking care of animals during the project.

## **CHAPITRE V**

### **DISCUSSION**

#### **5.1 Développement d'une nouvelle stratégie vaccinale pour l'induction d'une réponse immunitaire optimale contre le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin**

##### **5.1.1 Voie mucosale et adénovecteurs**

Puisque les macrophages sont le site principal de réplication du PRRSV, les lésions apparaissent principalement au niveau des poumons et des tissus lymphoïdes, lieux où les macrophages se retrouvent en grande quantité (Lawson et al., 1997; Xiao et al., 2004). Comme mentionné précédemment, la vaccination conventionnelle à base de vaccins vivants atténués ou inactivés n'a pas permis jusqu'à présent de conférer une protection optimale et sécuritaire contre le PRRSV (Madsen et al., 1998; Nielsen et al., 1997). Dans les chapitres II et III, la stratégie de vaccination fut basée sur l'induction d'une réponse immunitaire mucosale et systémique dans le but de générer une protection optimale contre le PRRSV. C'est pourquoi les animaux furent vaccinés à la fois par les voies intramusculaire et intranasale.

En ce qui a trait à la réponse immunitaire mucosale induite lors de vaccination, les antigènes comme les protéines ou les peptides sont dans l'incapacité d'induire une bonne réponse immunitaire (Lavelle, 2005). Différentes stratégies ont été développées pour délivrer des antigènes au niveau de l'épithélium respiratoire dont les vecteurs viraux. Ils peuvent activer eux-mêmes la réponse immunitaire innée ce qui est crucial pour le développement d'une réponse immunitaire adaptative contre



l'antigène. Le choix des adénovirus recombinants comme vecteurs viraux présentait alors plusieurs avantages (Torres et al., 1996; Zhu et al., 2007):

- Génome bien caractérisé et facile à manipuler
- Efficacité de transduction élevée
- Tropisme cellulaire important, infectant ainsi de nombreuses cellules aussi bien en division que quiescentes sans intégration au génome des cellules hôtes
- Possibilité d'utiliser des adénovirus humain de sérotype 5, de sorte que les porcs ne présentent pas d'immunité préexistante tout en étant totalement permissifs à ce type d'adénovecteurs
- Capacité à infecter les cellules du tractus respiratoire
- Capacité à induire une réponse immunitaire innée

De nombreuses études de vaccination ont rapporté l'utilisation des adénovirus recombinants non répliatifs. Cependant le Dr. Massie et son équipe ont démontré l'avantage de l'utilisation d'adénovirus répliatifs mais non disséminatifs (Oualikene et al., 2000). Ces adénovecteurs possèdent une mutation pour le gène de la protéase (PS). La protéase est une protéine tardive impliquée dans la maturation des protéines de la capsid et dans l'assemblage des particules virales. Ces adénovecteurs peuvent donc répliquer leur ADN normalement mais ne peuvent pas former de nouvelles particules infectieuses et donc se disséminer dans l'organisme (Weber, 2003). La capacité de répliation de l'ADN viral de ces adénovecteurs permet ainsi d'augmenter le nombre de copies du transgène et donc son expression qui est environ 10 fois supérieure par rapport à un système non répliatif (Bourbeau et al., 2007). Ce système a donc été sélectionné pour la réalisation des expériences présentées dans les chapitres II et III. Cependant, bien que la conception des différents adénovirus recombinants eût été réalisée, il s'est avéré que ce système ne nous permettait pas d'obtenir dans notre cas des titres viraux très élevés, généralement de  $10^9$  TCID<sub>50</sub>/ml, limitant ainsi les doses de vaccination à  $10^8$  TCID<sub>50</sub> par injection. En comparaison avec un système non répliatif commercialement distribué, les titres obtenus sont en

moyenne compris entre  $10^{10}$  et  $10^{11}$  TCID<sub>50</sub>/ml. Malgré les faibles titres obtenus avec ce type d'adénovecteurs, il a été décidé de les utiliser étant donné qu'une étude préliminaire nous a permis de constater que la réponse générée par ce type d'adénovecteurs, même avec une dose de  $10^8$  TCID<sub>50</sub> par injection, était supérieure à celle obtenue par immunisation de porcelets avec une dose de  $10^9$  TCID<sub>50</sub> d'adénovecteurs non réplicatifs (résultats non montrés).

La différence dans les titres viraux pourrait s'expliquer par le fait que la lignée complémentaire utilisé pour produire les adénovecteurs réplicatifs exprime la protéase. Or, il a été démontré que la protéase des adénovirus est capable de cliver la cytokératine K18 cellulaire, ce qui entraîne une déstabilisation du cytosquelette et donc facilite la lyse de la cellule. Ceci entraînerait donc une diminution de la croissance cellulaire et donc une diminution du rendement en terme de particules infectieuses produites (Chen et al., 1993; Oualikene et al., 2000).

### 5.1.2 Réponse mucoale

L'activation du système immunitaire des voies respiratoires est médiée par des structures lymphoïdes associées à l'épithélium des bronches et à celle localisées au bas du tractus respiratoire (BALT) mais aussi par les structures lymphoïdes associées au larynx (LATL) et aux amygdales naso-pharyngiennes (NALT) (Ogra et al., 2001). Les tissus lymphoïdes de l'anneau de Waldeyer sont bien développés chez les porcs et permettent aussi la captation du pathogène (Liebler-Tenorio et Pabst, 2006). Après une administration intranasale, les antigènes se retrouvent par transcytose au niveau des cellules M (« microfold ») qui sont présentes au niveau de l'épithélium mucosal (Fujimura, 2000). Les antigènes vont ensuite être captés par les cellules dendritiques et les cellules B qui vont alors présenter l'antigène aux cellules T. De plus, les cellules dendritiques vont migrer via la circulation lymphatique jusqu'aux ganglions lymphatiques afin d'activer les cellules B et T (Banchereau et al., 2000). Les cellules B et T vont ensuite migrer par un mécanisme de « homing » aux sites mucoaux

effecteurs de la lamina propria. Au niveau de ces tissus, les lymphocytes T cytotoxiques vont éliminer les cellules infectées et les plasmocytes vont sécréter majoritairement des IgA sécrétoires (sIgA) mais aussi des IgM sécrétoires (Heath et Carbone, 2001). Les sIgA permettent d'inhiber l'interaction du virus avec les récepteurs présents à la surface des muqueuses. Ils sont aussi présents au niveau du sérum permettant ainsi une seconde ligne de défense contre les pathogènes qui ont passé à travers la surface mucosale (Snoeck et al., 2006). De plus, grâce au système immunitaire commun aux muqueuses, les sIgA peuvent se retrouver au niveau des autres sites mucosaux (Mestecky, 1987).

Dans notre étude, les animaux immunisés par les voies intranasale et intramusculaire ont développé des anticorps spécifiques (IgG et IgA) à la GP5 au niveau pulmonaire. Cependant, la présence d'IgA était plus importante au niveau des LBA dans le cas où les animaux ont reçu un rappel avec de la rGP5 ou le vaccin inactivé administré par voie systémique. Théoriquement, il aurait été attendu d'observer un taux plus important d'IgA spécifiques à la GP5 chez les animaux ayant reçu une vaccination par la voie intranasale. Ces données suggèrent donc qu'une partie importante des IgA retrouvés au niveau des LBA est dûe au passage passif des anticorps du sérum au niveau des muqueuses par transudation (Belyakov et Ahlers, 2009) et qu'une immunisation même par voie uniquement systémique comme c'est le cas avec les groupes ayant reçu le vaccin inactivé permet de générer une protection au niveau mucosal. Afin de pouvoir réellement conclure quand à l'efficacité d'une stratégie d'immunisation par voie intranasale, il aurait été nécessaire de vacciner les animaux uniquement par cette voie.

### 5.1.3 Les protéines d'intérêt du PRRSV

Deux antigènes principaux du PRRSV ont été exprimés par le système d'adénovirus recombinant (rAdVs). Le premier est la glycoprotéine d'enveloppe GP5 qui est porteuse de l'épitope neutralisant majeur (Pirzadeh et Dea, 1997) et le deuxième est la protéine de matrice M. Bien que la protéine M soit aussi porteuse d'épitopes neutralisants (Yang et al., 2000), elle permet surtout de générer une réponse cellulaire (Bautista et Molitor, 1997). Il a été démontré que lorsque co-exprimée ou fusionnée avec la protéine GP5, elle permet de générer une meilleure réponse contre la protéine GP5 (Jiang et al., 2006a; Jiang et al., 2006b; Zheng et al., 2007). Dans le chapitre II, la vaccination des porcs avec les rAdVs exprimant les protéines M et GP5 sous forme d'une protéine de fusion a permis également de générer une meilleure réponse en IgG contre la GP5 que les porcs ayant reçu les rAdVs exprimant seulement la GP5 (Fig. 2.2). Les protéines M et GP5 sont connues pour s'associer ensemble via des ponts disulfures et ainsi former des hétérodimères à la surface du virion (Mardassi et al., 1996). Comme pour l'EAV, ces hétérodimères sont formés au niveau du réticulum endoplasmique des cellules infectées (Faaberg et Plagemann, 1995; Mardassi et al., 1996) et cette étape serait essentielle au transport de ces deux protéines au niveau de l'appareil de Golgi (Balasuriya et al., 2000). À ce niveau, les modifications post-traductionnelles de la GP5 ont alors lieu et il est supposé que l'hétérodimérisation avec la protéine M permet une conformation optimale des épitopes de la GP5 ce qui pourrait expliquer l'induction d'une meilleure réponse immunitaire dans le cadre de vaccination co-exprimant les protéines M et GP5 (Jiang et al., 2006b). L'hétérodimérisation de la protéine M avec la GP5 est aussi impliquée dans la liaison du virus au récepteur à la sialoadhésine, ce qui en fait une cible de choix pour la génération de vaccins efficaces (Van Breedam et al., 2010).



#### 5.1.4 Mutations de la protéine GP5 et réponse en anticorps neutralisants

Étant donné la présence d'un épitope leurre au niveau de la GP5 et de glycosylations masquant l'épitope neutralisant, des mutations ont été introduites dans la séquence de la GP5 afin d'augmenter la réponse immunitaire induite. Au début de cette étude, il a donc été décidé de générer deux adénovecteurs différents, l'un exprimant les protéines M et GP5 en fusion (rAdV M-GP5) et un autre exprimant la protéine M et une forme mutée de la GP5 en fusion (rAdV M-GP5m). Suite à la vaccination des animaux, il a été démontré que l'utilisation des rAdVs exprimant la forme mutée de la GP5 permettait de générer une meilleure réponse en anticorps ainsi qu'une meilleure protection (diminution de la virémie) suite à l'infection expérimentale.

Les différentes mutations réalisées au niveau de la GP5 ont consisté tout d'abord dans l'introduction d'une séquence Pan DR T cell epitope (PADRE) entre l'épitope leurre et l'épitope neutralisant. Cette séquence de 13 acides aminés correspond à un épitope universel qui, chez l'humain, a une affinité augmentée pour une quinzaine de molécules HLA-DR les plus communes (Alexander et al., 1994). Cette séquence a été utilisée dans de nombreuses études de vaccination afin d'augmenter la réponse immunitaire (Alexander et al., 2000; Decroix et al., 2002; Rosa et al., 2004). Elle a été aussi utilisée dans le cadre de la vaccination contre le PRRSV, montrant sa capacité à augmenter la réponse immune contre la GP5 (Fang et al., 2006; Jiang et al., 2009; Jiang et al., 2007c; Li et al., 2009a; Wang et al., 2007a). Cependant, dans toutes les études de vaccination contre le PRRSV, il n'a pas été déterminé si cette séquence PADRE permettait par elle-même d'augmenter la réponse immunitaire générée ou si cette séquence, par son insertion entre l'épitope leurre et neutralisant, permettait par l'espacement qu'elle créait une meilleure reconnaissance de l'épitope neutralisant.

La seconde modification introduite dans la séquence de la GP5 a consisté à muter la séquence de l'épitope leurre (remplacement de la séquence A<sup>27</sup>L<sup>28</sup>V<sup>29</sup>N<sup>30</sup> par

S<sup>27</sup>G<sup>28</sup>S<sup>29</sup>G<sup>30</sup>), éliminant de ce fait cet épitope et la glycosylation en N30. Cet épitope leurre est reconnu très fortement par les sérums de porcs dans la phase précoce de l'infection où aucun anticorps neutralisant n'est encore détectable (Ostrowski et al., 2002). Il a été démontré que le remplacement de celui-ci par la séquence SGS<sub>G</sub> permettait de diminuer considérablement sa reconnaissance par le système immunitaire (Ostrowski et al., 2002).

La dernière modification a consisté à muter le site de glycosylation au niveau du résidu N51 car il a été démontré que des souches comportant ce type de mutation sont plus sensibles à la neutralisation (Ansari et al., 2006b; Vu et al., 2011). Il a été décidé dans cette étude de ne pas muter le site de glycosylation au niveau du résidu N44 car des souches de PRRSV comportant la glycosylation en N44 sont capables d'induire une réponse en anticorps neutralisants plus rapide et plus importante que des souches portant une mutation en N44 (Faaberg et al., 2006).

Les différentes mutations réalisées au niveau de la GP5 auraient donc du permettre théoriquement de générer une meilleure réponse en anticorps neutralisants. Or, dans les chapitres II et III, on peut noter qu'il n'a pas été possible de détecter des anticorps neutralisants lors de la phase d'immunisation pour aucun des groupes. Ces résultats sont assez surprenants puisque des stratégies d'immunisation basées sur le même type de mutations, à savoir que l'utilisation de vaccin ADN chez le porc exprimant une GP5 mutée pour les sites de glycosylations N30, N34, N35 et N41 et comportant une séquence PADRE entre l'épitope leurre et neutralisant, a permis de générer une meilleure réponse en anticorps neutralisants que l'utilisation d'une GP5 WT (Li et al., 2009a). Le fait de ne pas détecter d'anticorps peut signifier que les doses d'adénovecteurs utilisées lors des immunisations n'étaient pas suffisantes pour générer ce type de réponse.

La détection des anticorps neutralisants a été seulement possible après l'infection expérimentale pour deux groupes de porcs. Le premier avait reçu la protéine recombinante GP5 en rappel suite à une primo-immunisation avec les rAdVs M-

GP5m et dans ce cas, seulement deux porcs ont développé des anticorps neutralisants à des titres très faibles. L'autre groupe, ayant reçu le vaccin commercial inactivé, a généré des anticorps neutralisants à des titres plus élevés. Le groupe M-GP5m/rGP5 a développé une virémie plus importante que le groupe témoin, le groupe vaccin inactivé a montré une virémie très faible post-infection et les groupes ayant reçu les rAdVs M-GP5 ou M-GP5m ont développé une virémie plus faible que le groupe témoin mais plus élevée que le groupe vaccin inactivé bien qu'il n'eut pas été possible de détecter d'anticorps neutralisants. Il est donc difficile d'après nos données d'établir un corrélat de protection basé sur la présence de ces anticorps bien que les porcs ayant développé les plus forts titres d'anticorps neutralisants sont ceux dont la virémie est la plus faible et présentant le moins de lésions pulmonaires.

A l'heure actuelle, l'association entre anticorps neutralisants et la protection est controversée (Murtaugh et Genzow, 2011). En effet, il a été démontré *in vitro* que la présence de ces anticorps empêchait l'infection des macrophages (Delputte et al., 2004). De plus, le transfert passif de ces anticorps (titre de 1/16) permettait de générer une protection (Osorio et al., 2002). Dans une autre étude, la présence d'anticorps neutralisants à un titre de 1/8 corrélait avec une inhibition de la réplication virale mais n'empêchait pas la transmission aux autres animaux (un titre de 1/32 étant nécessaire pour assurer une protection complète) (Lopez et al., 2007). Cependant, d'autres données viennent en contradiction avec ce postulat. En effet, dans certains cas, une résolution de la virémie avant l'apparition des ces anticorps a été observée (Diaz et al., 2006; Nelson et al., 1994) et le virus peut être présent dans le sérum malgré des titres en anticorps neutralisants de 1/16 ou 1/32 (Vezina et al., 1996). Ces données suggèrent donc la difficulté d'établir un corrélat de protection et de virémie avec la présence d'anticorps neutralisants.

De nombreuses études se sont intéressées à l'épitope neutralisant de la GP5 et au fait que les glycosylations de la GP5 entraînaient une diminution de la reconnaissance de cet épitope par le système immunitaire. Cependant, le PRRSV possède d'autres

glycoprotéines (GP2a, GP3, GP4). Il a été récemment démontré que les glycosylations de la GP3, notamment celle en position N131 permettait de protéger le virus de la neutralisation, suggérant la possibilité d'un épitope neutralisant important au niveau de la GP3. Une autre hypothèse avancée dans cette étude est qu'étant donné que la GP3 forme un complexe multiprotéique avec la GP2a et la GP4 à la surface du virion, la glycosylation de la GP3 pourrait alors masquer un épitope important au niveau de la GP2a ou de la GP4 (Vu et al., 2011). Ces résultats sont cependant en contradiction avec une autre étude montrant que l'infection de porcs avec des souches mutantes du PRRSV exprimant des formes hypoglycosylées des protéines mineures d'enveloppe ne permettait pas de générer une meilleure réponse en anticorps neutralisants. Il est cependant suggéré dans cette étude que les glycosylations de la GP5 pourraient là aussi venir masquer les épitopes neutralisants des protéines mineures d'enveloppe (Das et al., 2011). Ces données suggèrent donc l'importance de déterminer plus précisément le rôle des glycoprotéines mineures d'enveloppe dans l'établissement d'une réponse immunitaire protectrice.

#### **5.1.5 Réponse cellulaire**

Malgré l'absence d'anticorps neutralisants détectables pour les groupes ayant reçu les AdVs M-GP5 et M-GP5m, on peut voir une diminution de la virémie dans ces deux groupes après l'infection expérimentale. Ces résultats corrélerent avec le fait que ces deux groupes ont une réponse cellulaire supérieure aux autres groupes d'animaux lors de la phase d'immunisation. Il est possible de noter également que la réponse cellulaire est meilleure dans le cas où les porcs ont reçu 2 fois les rAdVs exprimant la M-GP5m que chez les animaux ayant reçu une fois les rAdVs M-GP5m puis le rappel avec la rGP5. Ceci peut-être attribué au fait que les rAdVs sont connus pour induire une bonne réponse cellulaire contre un antigène (Liu, 2010; Tutykhina et al., 2011). Un dosage de l'INF- $\gamma$  (marqueur de la réponse cellulaire) a été réalisé dans les sérums des animaux aux jours 28, 35 et 49 post-immunisation, ainsi qu'aux jours 3, 5, 7, 14



et 21 post-infection expérimentale. Ces données n'ont pas permis de déterminer la présence de cette cytokine dans les sérums, hormis aux jours 3 et 5 post-infection où une faible quantité d'INF- $\gamma$  est détectable (en moyenne 20 pg/ml) mais aucune différence n'est visible entre les différents groupes, suggérant que cette élévation d'INF- $\gamma$  est la résultante de la réponse immune induite seulement par l'infection (Wesley et al., 2006). Différents tests réalisés sur les surnageants de culture de PBMCs restimulées en présence de virus inactivé n'ont pas démontré non plus la présence d'INF- $\gamma$ .

#### 5.1.6 PRRSV et ADE

Dans le chapitre III, il a été observé que les porcs ayant reçu de la GP5 recombinante produite par des bactéries comme rappel de vaccination ont développé la meilleure réponse en anticorps. Cependant suite à l'infection expérimentale, ces mêmes porcs ont montré une virémie supérieure au groupe témoin, suggérant que les anticorps produits ont dans ce cas augmenté la réplication virale au lieu d'avoir un effet protecteur, phénomène connu sous le nom d'anticorps facilitants ou ADE. Le mécanisme d'ADE a été suggéré pour le PRRSV suite à différentes études. En effet, il a été démontré que l'infection de macrophages alvéolaires en présence de sérum contenant des anticorps spécifiques au PRRSV entraînait une augmentation de la réplication virale et que l'infection de porcs ayant préalablement reçu des IgG spécifiques au PRRSV résultait en une virémie plus élevée et plus longue (Christianson et al., 1993; Yoon et al., 1996). Cependant, ce phénomène d'ADE serait variable selon les isolats viraux utilisés (Yoon et al., 1997). Des porcs immunisés avec de la protéine recombinante GP5 produite chez *E. coli* présentaient des lésions pulmonaires plus sévères après une infection expérimentale (Pirzadeh et Dea, 1998). En 2004, il a été démontré *in vitro* que les protéines GP5 et N étaient impliquées dans ce mécanisme d'ADE (Cancel-Tirado et al., 2004).

Il existe plusieurs mécanismes d'ADE :

- Le plus commun est celui qui consiste dans la reconnaissance de complexes virus-anticorps par les récepteurs aux fragments Fc (FcγR) présents sur la surface des macrophages, des monocytes, des cellules B, des éosinophiles et des granulocytes. Ceci permet d'augmenter l'attachement du virus à la surface des cellules permissives et donc sa liaison aux récepteurs spécifiques et sa réplication (Takada et Kawaoka, 2003).
- La reconnaissance des complexes virus-anticorps peut aussi se faire par le complément, l'activation de la voie classique du complément aboutit alors à la liaison du C3d sur le complexe qui se lie aux récepteurs du complément présents sur les cellules phagocytaires permettant alors comme précédemment d'augmenter la liaison du virus à son récepteur spécifique et sa réplication (Sauter et Hober, 2009).
- Un troisième mécanisme décrit pour le virus EBOLA consiste en la reconnaissance du complexe virus-anticorps là aussi par le complément. Le complexe C1q peut alors se lier à son récepteur (C1qR) présent à la surface de nombreuses cellules augmentant ainsi la liaison du virus et sa réplication (Takada et al., 2003).
- Un autre mécanisme proposé pour le VIH est que la liaison des anticorps sur la protéine GP120 entraîne une modification de conformation de la protéine. Cette modification a pour conséquence une augmentation de l'affinité de la GP120 pour son co-récepteur CCR5 ce qui entrainerait une augmentation de l'infection des cellules cibles après liaison au CD4 (Sullivan et al., 1998).

Dans le cas du PRRSV, il existe très peu de données concernant le mécanisme d'ADE impliqué. Cependant, il a été récemment démontré *in vitro* une augmentation de la réplication virale qui est médiée par les récepteurs porcins FcγRIIb. Le récepteur porcin FcγRIIb est un récepteur Fcγ inhibiteur qui inhibe l'activation des cellules immunitaires (Qiao et al., 2011). Cette modification de la signalisation intracellulaire est connue sous le terme d'iADE (intrinsic antibody-dependant

enhancement). L'iADE est connue pour faciliter d'une part l'entrée du virus dans les macrophages mais aussi pour modifier les mécanismes antiviraux intracellulaires aboutissant à une suppression de la réponse immunitaire innée, une augmentation de la sécrétion d'IL-10 et une orientation vers une réponse immune de type Th2 (Halstead et al., 2010). Ce mécanisme devra être confirmé dans le futur pour le PRRSV par d'autres études.

D'après les résultats obtenus dans le chapitre III, l'utilisation de la GP5 produite par des bactéries n'est pas une bonne stratégie pour induire une réponse immunitaire protectrice. Étant donné que les bactéries ne réalisent pas de modifications post-traductionnelles, la GP5 utilisée dans ce cas ne possède pas de glycosylations. La possibilité que ces dernières viennent masquer l'épitope neutralisant de la GP5 n'est donc pas plausible. L'épitope neutralisant étant un épitope linéaire (Pirzadeh et Dea, 1997; Plagemann et al., 2002), il serait intéressant de réaliser des immunisations avec une GP5, produite par des bactéries, mutée dans la séquence de l'épitope leurre ce qui pourrait peut-être permettre de diminuer significativement la réponse en anticorps non neutralisants générée par l'utilisation d'une GP5 WT.

### **5.1.7 Réponse induite par le vaccin inactivé**

Dans les chapitres II et III de cette étude, un vaccin inactivé a été utilisé afin de comparer l'efficacité de nos stratégies de vaccination. Il n'a pas été possible d'utiliser un vaccin atténué étant donné le risque de propagation associé à ce type de vaccin dans les élevages. Cependant, à l'heure actuelle, aucun vaccin inactivé n'est disponible sur le marché nord-américain. En effet, depuis 2005, ce type de vaccin est discontinué en Amérique du Nord (Charerntantanakul, 2012). Il a donc été décidé d'utiliser le vaccin Ingelvac PRRSV MLV qui est un vaccin atténué que nous avons inactivé suite à un traitement à la chaleur (1 h à 56°C). Il aurait été cependant très intéressant de réaliser l'étude avec un des vaccins atténués disponible car ces derniers

sont ceux utilisés dans les élevages aujourd'hui. Cependant, des études réalisées avec des vaccins commerciaux inactivés basés sur des souches de génotype Européens ont démontré que ce type de vaccin :

- Génère une très faible, voir pas de réponse en anticorps suite à l'immunisation (Kim et al., 2011b; Vanhee et al., 2009);
- Génère une très faible réponse cellulaire suite à l'immunisation (Bassaganya-Riera et al., 2004; Piras et al., 2005);
- Induit une réponse humorale anamnétique suite à une infection expérimentale (Vanhee et al., 2009; Zuckermann et al., 2007);
- Ne permet pas de diminuer la virémie (Vanhee et al., 2009; Zuckermann et al., 2007);
- Ne protège pas contre la transmission transplacentaire du virus (Scortti et al., 2007);
- Aurait cependant un effet bénéfique sur le long terme chez les troupeaux présentant une séroprévalence importante pour le PRRSV (Papatsiros et al., 2006).

Différents adjuvants ont été utilisés pour essayer d'améliorer l'efficacité de ce type de vaccin, dont notamment l'utilisation de CpG (Quan et al., 2010) ou bien encore l'utilisation d'adjuvant incomplet de Freund (Vanhee et al., 2009). Différentes techniques d'inactivation du virus ont aussi été testées afin d'améliorer la conservation des épitopes antigéniques qui sont importants pour l'établissement d'une immunité protectrice. Il a été démontré qu'une inactivation du virus suite à un traitement aux UV ou au BEI (éthylèneimine binaire) permettait d'obtenir une bien meilleure efficacité de protection que l'utilisation du vaccin commercial inactivé Progressis, disponible en Europe (Vanhee et al., 2009) car ces deux techniques permettraient de préserver les domaines viraux impliqués dans l'entrée du virus (Delrue et al., 2009).

Il est difficile dans notre cas de comparer les résultats obtenus avec ceux de la littérature étant donné le manque d'études réalisées avec des vaccins inactivés basés sur des génotypes nord-américains. Cependant, on peut noter que les animaux immunisés avec le vaccin inactivé ont généré une bonne réponse en anticorps



spécifiques à la GP5 suite à l'immunisation mais pas d'anticorps neutralisants. Suite à l'infection expérimentale, ces animaux ont développé des anticorps neutralisants, une très faible virémie ainsi que très peu de lésions pulmonaires par rapport aux autres groupes, indiquant un effet protecteur de notre vaccin inactivé contre une souche homologue pour l'épitope neutralisant de la GP5. Il serait cependant intéressant de comparer ce type d'inactivation avec une inactivation aux UV ou au BEI dont l'efficacité a été démontrée dans le cas de souche de génotype européen.

#### **5.1.8 Perspective**

Dans cette étude, il a été démontré que l'utilisation d'adénovecteurs réplicatifs mais non disséminatifs exprimant des protéines d'intérêt du PRRSV permettaient de générer une réponse immunitaire spécifique et une diminution de la virémie après infection expérimentale. A l'heure actuelle, toutes les stratégies de vaccination proposées n'ont toujours pas permis d'obtenir une protection optimale et sécuritaire (Murtaugh et Genzow, 2011). La littérature actuelle s'accorde pour dire qu'il existe encore de nombreux obstacles avant de pouvoir développer un tel vaccin dont notamment l'identification précise des composants viraux qui affectent la réponse immune chez l'hôte (Murtaugh et Genzow, 2011; Thanawongnuwech et Suradhat, 2010). Il est aussi nécessaire dans le futur de déterminer quelles sont les protéines du PRRSV impliquées dans l'induction de la réponse aux cellules T. Jusqu'à présent, il a été démontré que la protéine M était porteuse des épitopes majeurs T impliqués dans la réponse cellulaire (Bautista et al., 1999). Les séquences de quatre nouveaux épitopes T immunodominants ont d'ailleurs été identifiées récemment (Wang et al., 2011). Il a été également démontré que la GP5 des souches de génotypes II comportait deux séquences correspondant à des épitopes immunodominants reconnus par les cellules T (Vashisht et al., 2008). De nouvelles études sont actuellement en cours afin de déterminer les épitopes présents au niveau des nsp et ont en outre mis en

évidence des épitopes T au niveau de la nsp9, nsp10 et nsp11. La structure de ces épitopes reste encore à déterminer (Parida et al., 2012).

L'identification des protéines ou de peptides associés à la virulence permettraient de générer des clones infectieux délétés pour la génération d'un vaccin inactivé. Des études préliminaires ont démontré que parmi les gènes non structuraux, la région correspondant à la nsp3-8 comporterait les déterminants majeurs de virulence et que la GP5 serait la protéine structurale majeure associée à la virulence (Kwon et al., 2008).

Un autre problème majeur dans le développement d'un vaccin efficace est que le PRRSV présente un fort degré de variabilité aux niveaux génétique et antigénique, notamment entre les souches de type I et II (Murtaugh et al., 2010). Chaque type est composé de nombreux génotypes qui se retrouvent au niveau de zones géographiques hétérogènes (Stadejek et al., 2006). De plus, les souches virales de PRRSV retrouvées peuvent varier selon les élevages, les troupeaux et les animaux dans un même troupeau (Goldberg et al., 2000; Goldberg et al., 2003). Il a été suggéré que le PRRSV pouvait exister sous forme de quasi-espèce au cours d'une infection de champ suggérant l'émergence de souches virales avec de nouvelles propriétés cliniques et antigéniques (Goldberg et al., 2003; Music et Gagnon, 2010). Ces données montrent la difficulté de développer un vaccin universel efficace.

## **5.2 Développement de vaccins bivalents contre les infections porcines mixtes**

Dans le chapitre IV de cette thèse, il a été proposé de développer des vaccins bivalents pour la lutte contre les infections porcines mixtes étant donné que les pathologies observées en condition de champ sont souvent la cause d'infections par plusieurs pathogènes. Des vaccins à base d'adénovirus recombinants exprimant des protéines de trois pathogènes différents (le PRRSV, le PCV2b et *M. hyopneumoniae*) ont donc été développés. Pour cette étude, il a été choisi d'utiliser des adénovecteurs

non réplcatifs étant donné les difficultés rencontrées avec la génération des adénovecteurs réplcatifs mais non disséminatifs utilisés dans les chapitres II et III.

### **5.2.1 Diminution de la réponse en anticorps lors des fusions avec la GP5**

Après la vaccination des souris, il a été observé que les différentes constructions ont permis de générer une réponse en anticorps spécifique à chacune des protéines d'intérêt. Cependant, la réponse humorale générée contre la GP5 était relativement faible en comparaison des réponses induites contre les protéines Cap et P97c. De plus, lorsque la GP5 était fusionnée soit à la protéine Cap soit à la protéine P97c, une diminution de la réponse en anticorps contre la Cap ou la P97c a été observée si l'on compare à la réponse obtenue dans le cadre d'immunisations réalisées avec ces protéines seules. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que la fusion de la GP5 en C-terminale des autres protéines aurait pu créer un encombrement stérique ne permettant pas une bonne reconnaissance des épitopes immunodominants de la Cap ou la P97c par le système immunitaire. Il aurait été intéressant de fusionner la GP5 en N-terminal afin de voir si dans ce cas la reconnaissance se ferait mieux avec comme résultante une bonne réponse immunitaire.

### **5.2.2 Réponses en anticorps neutralisants**

Bien que la fusion de la P97c ait permis d'augmenter la réponse en anticorps totaux spécifiques à la GP5, elle n' a pas permis de générer une réponse en anticorps neutralisants contre le PRRSV. Ces résultats sont en accord avec certaines études démontrant la difficulté à générer des anticorps neutralisants suite à l'utilisation de vaccins sous-unitaires ou inactivés (Gagnon et al., 2003; Misinzo et al., 2006; Qiu et al., 2005).

En ce qui concerne les vaccinations réalisées avec la P97c et la protéine Cap, il a été observé que la fusion de la protéine Cap en N-terminal de la P97c permettait de

généraliser une meilleure réponse en anticorps neutralisants contre le PCV2b que lors de la fusion en C-terminal de la P97c, bien que cette dernière fusion permette de générer une meilleure réponse en anticorps totaux. Une des hypothèses pour expliquer ce résultat est que la fusion en N-terminal favorise la reconnaissance de ou des épitopes neutralisants de la protéine Cap. Il existe peu d'informations concernant les épitopes importants au niveau de la protéine Cap du PCV2. En 2000, une analyse par PEPSCAN a montré la présence de 4 régions immunodominantes au niveau de la protéine Cap (a.a. 65-87 ; 113-147, 157-183, 193-207) (Mahe et al., 2000). Une autre étude a mis en évidence la présence d'au moins 5 épitopes conformationnels impliquant les acides aminés 47-85, 165-200 et 230-233 (Lekcharoensuk et al., 2004). Les acides aminés 1-60 et 231-233 seraient impliqués dans la formation d'épitopes neutralisants conformationnels aussi bien pour le PCV1 que le PCV2 (Shang et al., 2009). Cependant des études ont suggéré qu'il existait de fortes différences antigéniques au niveau de la capside des différentes souches de PCV2 et qu'un épitope neutralisant commun aux différentes souches de PCV2 était peu probable (Huang et al., 2011; Lefebvre et al., 2008).

### 5.2.3 Réponse cellulaire induite

Dans le chapitre IV, les résultats présentés concernent uniquement la réponse en anticorps générée chez des souris contre les différentes protéines d'intérêt. Dans l'expérience 1 du chapitre IV, un test de lymphoprolifération spécifique au PRRSV a également été réalisé mais n'a pas été inclus dans les résultats de l'article. Ces données (Figure A.1) montrent une moyenne de l'index de stimulation (SI) pour la GFP de 1.76, pour le groupe M-GP5 (SI = 2.28), pour le groupe Cap-GP5 (SI = 1.86) et pour le groupe P97c-GP5 (SI = 2.14). Après analyse statistique des résultats avec une ANOVA à une variable et une comparaison multiple avec un test de Tukey's, seul le groupe M-GP5 est significativement différent du groupe GFP ( $p < 0.05$ ). Ces données suggèrent encore une fois l'importance de la protéine M pour induire une



réponse cellulaire spécifique à la GP5. On peut cependant noter que la fusion de la P97c a aussi permis d'induire une réponse cellulaire qui a une tendance à être supérieure aux groupes GFP et Cap-GP5 bien que cette dernière ne soit pas significativement différente. Des tests de lymphoprolifération spécifique au PCV2b et *M. hyopneumoniae* devront dans le futur être inclus afin de déterminer si de telles vaccinations permettent de générer une bonne réponse cellulaire. Les réponses en IgG2a, IgG2b et IgG3 induites dans le cadre de l'expérience 2 semblent cependant indiquer que les vaccinations réalisées à base de P97c sont capables d'induire une réponse immune de type cellulaire.

#### **5.2.4 Choix de la P97c pour établir une réponse protectrice contre *M. hyopneumoniae***

Comme mentionné dans l'introduction, la P97 est l'antigène de choix qui a été principalement utilisé dans le développement des vaccins sous-unitaires contre la PEP jusqu'à présent. Cependant, il a été démontré que bien que cette dernière permettait de diminuer significativement les lésions dues à la PEP, elle ne permettait pas de conférer une protection optimale (Okamba et al., 2010). Dans notre étude, il a quand même été décidé de travailler avec la P97 étant donné le manque d'information concernant les antigènes importants de *M. hyopneumoniae*, le but de l'étude étant d'établir une preuve de concept quand à la faisabilité de développer des vaccins bivalents contre des pathogènes d'importance chez le porc. Parmi les autres antigènes utilisés dans des vaccinations pour prévenir les infections à *M. hyopneumoniae*, on peut citer la protéine Mhp1 (King et al., 1997), la ribonucléotide réductase NrdF (Fagan et al., 1996; Fagan et al., 2001), la protéine P42 (portion C-terminale de la protéine de choc thermique P65 appartenant à la famille des HSP70) (Chen et al., 2003), ainsi qu'un mélange d'antigènes constitués des protéines P36, P46, NrdF, P97 ou P97R1 (Chen et al., 2008). Cependant, ces études de vaccination n'ont pas démontré un effet protecteur optimal contre la PEP. Il est nécessaire aujourd'hui de

mieux comprendre la base moléculaire de la pathogénicité induite par *M. hyopneumoniae* afin de pouvoir développer un vaccin optimal. Une récente étude (Simionatto et al., 2012) a identifié dans un modèle de souris un potentiel immunogénique de la protéine P102, de la protéine membranaire P95 (Mhp280), de la P37 et de la P146 (Mhp684). La protéine P146 est un paralogue de la P97 dont il vient d'être démontré qu'elle se lie aux cellules ciliées du tractus respiratoire via l'héparine et le plasminogène (Bogema et al., 2012). La P97 et la P102 comportent plusieurs paralogues. Ces paralogues sont connus pour être des gènes issus de la duplication génique qui peuvent avoir des fonctions similaires mais non identiques. Il a été suggéré que la présence de paralogues pouvait permettre de conférer une plus grande variabilité antigénique. Dans le cas de la reconnaissance d'un des antigènes de *M. hyopneumoniae* par l'hôte, ce dernier pourrait exprimer préférentiellement un gène paralogue afin d'échapper à la réponse immune (Hsu et Minion, 1998b). Cependant, ceci n'est qu'une hypothèse mais dans un tel cas, il faudra alors prendre en compte les différents paralogues de la P97 pour développer un vaccin efficace.

#### **5.2.5 La portion C-terminale de la protéine d'adhésion P97 de *M. hyopneumoniae* : une molécule potentiellement adjuvante ?**

Les vaccins conventionnels sont à base d'organismes entiers vivants atténués ou inactivés par un processus chimique. Toutefois, un regain de la virulence pour les premier type de vaccins, résultant alors en des maladies au lieu de la protection espérée, ou encore un processus inapproprié d'inactivation et une réponse immunitaire faible pour le deuxième type sont d'autant d'inconvénients importants auxquels les intervenants en santé humaine et animale sont confrontés (Gregoriadis, 1998). Ainsi le développement de vaccins sous-unitaires à base de protéines recombinantes ou encore à base de vecteurs qui, lorsqu'administrés, peuvent produire chez l'individu vacciné les protéines immunisantes d'intérêt sont des stratégies vaccinales de nouvelle génération qui peuvent éliminer les inconvénients des vaccins

vivants ou inactivés à base d'organismes entiers. Or, dans un cas ou dans un autre, l'utilisation d'un adjuvant immunitaire de choix est nécessaire pour induire des réponses immunitaires optimales (Brunner et al., 2010).

Actuellement, la majorité des adjuvants approuvés par la FDA pour un usage humain sont des adjuvants à base d'aluminium. Cependant ces derniers présentent l'inconvénient de ne pas permettre l'induction d'une réponse immune de type Th1 (cellulaire) qui est essentielle pour la protection contre plusieurs pathogènes autant intracellulaires qu'extracellulaires (Brunner et al., 2010; Lefeber et al., 2003). Le développement d'adjuvants efficaces et spécifiques est à l'heure actuelle indispensable afin d'augmenter et de prolonger la réponse immunitaire induite, de diminuer la quantité d'immunogène et de rappels nécessaires et d'orienter la réponse immune induite (Aguilar et Rodriguez, 2007; Reed et al., 2009). Hormis les adjuvants approuvés actuellement par les instances gouvernementales, de nombreuses molécules possèdent des propriétés adjuvantes (produits bactériens, microparticules, saponines, émulsions, acides nucléiques...) (Aguilar et Rodriguez, 2007). Ces propriétés peuvent être basées sur la capacité à augmenter la présentation de l'antigène, la protection de l'antigène de sa dégradation, la stimulation et/ou la modulation de la réponse immunitaire induite (Leroux-Roels, 2010). Le tableau A.1 donne un aperçu des différents types d'adjuvants actuels, ainsi que de leurs modes d'action.

Nos résultats préliminaires ont démontré que la moitié C-terminale de la P97 (P97c) lorsqu'utilisée à des fins vaccinales, était fortement immunogénique. La P97c, lorsque couplée avec la protéine GP5 du VRRRP ou la protéine Cap du PCV2b, a augmenté la réponse en anticorps dirigée contre la GP5 ou la Cap dans un modèle de souris, démontrant un effet adjuvant potentiel de la P97c. De plus, la fusion de la protéine P97c à la protéine Cap a permis d'augmenter la réponse en IgG1 (profil Th2) mais aussi en IgG2a, IgG2b et IgG3 (profil Th1) contre la protéine Cap, indiquant le potentiel de la P97c à induire une réponse immunitaire mixte (Th1 et Th2).

Une des hypothèses quand aux mécanismes d'action de la P97c comme adjuvant est que la P97c pourrait activer la réponse immunitaire innée via l'activation d'un récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires conservés (PRRs). Il existe quatre principales familles de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs) : les récepteurs Toll-Like (TLRs), les récepteurs intracytoplasmique de la famille des NODs (NLRs), les récepteurs intracytoplasmiques de la famille RIG-1like RNA helicase (RLRs), et les récepteurs de surface lectiniques de type C (CLRs) (Ueno et al., 2007; Villadangos et Schnorrer, 2007).

Étant donné que dans le chapitre IV la P97c a été exprimée à l'intérieur des cellules transduites avec les adénovirus recombinants, l'effet potentiellement adjuvant de la protéine pourrait être dû à l'activation d'un NLR. Les NLRs sont impliqués dans la reconnaissance intracellulaire de composants variés. Ils sont classés en deux sous-familles, les NODs (NOD 1-5) et les NALPs (NALP 1-14) (Ueno et al., 2007). Les NLRs les mieux caractérisés sont NOD1 et NOD2. Ces récepteurs reconnaissent des produits bactériens issus de la synthèse, dégradation ou remodelage du peptidoglycane comme le muramyl-dipeptide (Franchi et al., 2009). Leur activation conduit à celle des voies de signalisation NF- $\kappa$ B et MAPK (« Mitogen-activated protein kinase »), résultant en la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Certains NLRs de la sous-famille des NALPs sont impliqués dans la régulation de l'inflammasome, un complexe protéique permettant l'activation de la caspase-1. La caspase-1 permet le clivage de deux cytokines pro-inflammatoires, les pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18, rendant fonctionnelles ces dernières (Lee et Kim, 2007). Parmi les ligands répertoriés se trouvent la toxine létale de l'anthrax, la flagelline de *Salmonella* et la flagelline de *Legionella* qui interagissent avec NALP1b (Boyden et Dietrich, 2006), IPAF (Miao et al., 2006) et NAIP5 (Ren et al., 2006), respectivement.

Afin de confirmer ou d'infirmer si la P97c est capable d'activer la réponse immunitaire innée via un NLR, des cellules macrophagiques murines RAW264.7



pourraient être transfectées avec un plasmide exprimant la P97c (Wang et al., 2010). Comme alternative, des constructions à base de rétrovecteurs exprimant la P97c pourraient être envisagées comme ce fut le cas pour une étude sur la flagelline (Lightfield et al., 2008). Il sera ensuite possible de déterminer l'activation potentielle de NF- $\kappa$ B par western blot (Shanmugam et al., 2012). La présence de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires ou impliquées dans le recrutement de cellules de l'immunité (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12, CCL2, CXCL9 et CXCL10) pourra se réaliser par qRT-PCR et ELISA (Zheng et al., 2011). De plus, afin de déterminer l'implication de l'inflammasome, il serait possible de vérifier l'activation de la caspase-1 par Western blot à partir d'extraits des cellules transfectées (Broz et al., 2010).

Bien que dans le chapitre IV, la P97c ait été exprimée à l'intérieur des cellules, la protéine a pu également se retrouver dans le milieu extracellulaire. De fait, des résultats obtenus récemment avec des cellules dendritiques murines dérivées de la moelle osseuse ont aussi indiqué la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- $\alpha$ ) dans le surnageant des cellules exposées à de la P97c recombinante (E. Roques, M. Segura et D. Archambault; non publiées). La P97c pourrait donc être reconnue par un TLR extracellulaire (TLRs 1/2/4/6/5 et 11). Les TLRs sont classés selon leur localisation ou encore par le type de PAMPs (« motifs moléculaires associés aux pathogènes ») reconnus. Ils se caractérisent par un ectodomaine permettant la reconnaissance des PAMPs et d'un endodomaine TIR (Toll/IL-1 Receptor) qui permet la transduction du signal. Cette transduction du signal passe par un ensemble de molécules adaptatrices dont MyD88 qui va se fixer sur le domaine TIR des TLRs. Ceci résulte alors en la translocation au noyau de facteurs de transcription tels NF- $\kappa$ B et AP-1 (Kawai et Akira, 2007). Ces derniers induisent la synthèse de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires qui permettent le recrutement en outre de monocytes/macrophages et de cellules dendritiques et qui influencent le profil de la réponse immune adaptatrice subséquente (Iwasaki et

Medzhitov, 2004). Jusqu'à présent, divers TLRs sont connus pour être activés par des protéines. Le TLR4 reconnaît les protéines de choc thermique (Roelofs et al., 2006; Vabulas et al., 2001; Vabulas et al., 2002) mais aussi certaines protéines virales (comme la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial) (Kurt-Jones et al., 2000) ou bactériennes (Malley et al., 2003). La protéine d'enveloppe du virus de la tumeur mammaire de souris active directement les cellules B via le TLR4 (Rassa et al., 2002). La profiline des apicomplexes (dont fait partie *Toxoplasma*) est connue pour activer directement le TLR11 (Yarovinsky et al., 2005). La stimulation des CPAs par la protéine Ov-ASP-1 dérivée d'*Onchocerca volvulus*, un helminthe, est dépendante de TLR2 et TLR4 à la fois (He et al., 2009). La protéine la plus étudiée et connue pour activer un TLR demeure la flagelline qui a comme ligand le TLR5 (Mizel et Bates, 2010).

Afin de déterminer si la protéine P97c est capable d'activer un TLR extracellulaire, des expériences additionnelles exhaustives devront être réalisées. Une stimulation des cellules RAW264.7 avec de la protéine P97c pourra être effectuée. Les mêmes composantes que précédemment, à savoir l'activation du facteur NF- $\kappa$ B et la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires pourront être déterminées. Des cultures primaires de cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris pourraient également être utilisées pour confirmer les résultats obtenus (Segura et al., 2007).

Dans le cas où la P97c est capable d'activer la réponse immunitaire innée, il serait alors aussi intéressant de déterminer la séquence minimale de cette dernière qui est apte à stimuler adéquatement la réponse, à savoir tout particulièrement si les séquences de la P97c correspondant aux motifs R1 ou R2 sont suffisantes. Une détermination du NLR ou TLR activé pourra aussi être réalisée entre autre grâce à des services commerciaux de screening de ligands de PRRs (Funderburg et al., 2007).

Il serait également intéressant de déterminer le potentiel de la P97c à activer les cellules dendritiques *in vivo*. En effet, les cellules dendritiques jouent un rôle important dans le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptatrice. Ceci pourrait se réaliser par exemple chez la souris en injectant de façon intra-péritonéale de la P97c et en réalisant un marquage des cellules dendritiques issues des splénocytes (Braga et al., 2010) [CD80/86, CD40 et CMHII qui sont des marqueurs des cellules dendritiques activées (Shortman et Liu, 2002)]. Il est également possible de réaliser des marquages pour les différentes sous-populations de cellules dendritiques ( $CD8\alpha^+$  et  $CD8\alpha^-$ ). Finalement, il sera indispensable d'évaluer le pouvoir adjuvant de la P97c dans différents modèles d'immunisation.

## CONCLUSION

Hormis les effets économiques catastrophiques reliés aux maladies virales porcines, l'exemple de la pandémie de grippe H1N1 en 2009 démontre plus que jamais les risques potentiels que représentent les pathogènes dont les hôtes sont des animaux. L'impact des pathogènes porcins sur la santé animale, la sécurité alimentaire et l'économie mondiale sont d'autant éléments qui démontrent la nécessité de développer de nouveaux outils afin d'assurer une biosécurité optimale dans les élevages.

Les travaux réalisés dans cette thèse ont permis dans un premier temps de tester l'efficacité d'une nouvelle stratégie vaccinale pour lutter contre le PRRSV. Les différentes constructions vaccinales générées ont induit une réponse immunitaire chez le porc et il s'est avéré que l'utilisation d'adénovecteurs réplicatifs mais non disséminatifs co-exprimant les protéines M et GP5m permettaient de conférer le meilleur degré de protection contre la maladie. Bien que la protection obtenue ne fut pas totale, cette étude novatrice, de part la voie d'immunisation intranasale et le vecteur vaccinal, apporte de nouvelles données dans le domaine pour permettre l'établissement futur d'un vaccin sans faille.

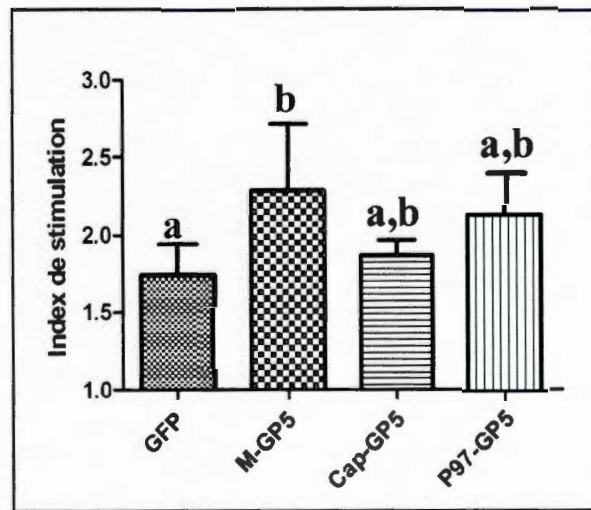
Dans un deuxième temps, les travaux de cette recherche ont porté sur l'établissement d'une preuve de concept pour la génération de vaccins bivalents contre des pathogènes d'importance chez le porc. Ces pathogènes sont le PRRSV, le PCV2 et *M. hyopneumoniae* étant donné qu'ils sont intimement liés dans le cadre d'infections porcines mixtes. Les différents vaccins générés ont permis d'induire chez la souris une réponse immunitaire spécifique contre l'un ou l'autre de ces pathogènes. De plus amples études devront être réalisées chez l'hôte afin de valider le caractère



protecteur de ces différents vaccins. Fait intéressant, cette étude a mis en lumière un effet potentiellement adjuvant de la protéine P97c de *M. hyopneumoniae*. La quête d'identifier et de développer de nouveaux adjuvants efficaces en vaccinologie étant encore aujourd'hui plus que jamais de mise, de nombreuses études pourront être réalisées afin de déterminer par quels mécanismes la P97c module la réponse immunitaire.

## APPENDICE A

### FIGURES SUPPLÉMENTAIRES



**Figure A.1 :** Lymphoprolifération spécifique à la GP5 au jour 49 post-immunisation.

Des souris Balb/c ont été immunisées aux jours 0 et 14 avec  $10^9$  TCID<sub>50</sub> d'adénovirus recombinants exprimant les protéines GFP (témoin négatif), M-GP5, Cap-GP5 ou P97c-GP5. Au jour 49 post-immunisation primaire, les splénocytes de chaque souris ont été mis en culture ( $4 \cdot 10^5$  cellules/puits) en présence de 1  $\mu$ g/puits de protéine recombinante GP5 pendant 72 h. Les cellules ont été mises en présence de thymidine tritiée 24 h avant leur récolte. Les résultats obtenus, suivant une incubation totale de 96h, sont exprimés sous forme d'index de stimulation qui correspond au ratio du nombre de CPM des cellules stimulées avec la GP5 sur le nombre de CPM des cellules non stimulées. Les données représentent la valeur moyenne + SD pour chaque groupe (n = 5). L'analyse statistique est une ANOVA à une variable suivie d'une comparaison multiple avec un test de Tukey's. Si deux groupes ne sont pas significativement différents ( $P > 0.05$ ), la même lettre est utilisée.

**Tableau A.1 : Liste des principaux adjuvants ainsi que leurs modes d'action**

Type	Exemple	Mode d'action / Remarque	Réponse immunitaire majoritairement induite
Sels d'aluminium (Alum)	Hydroxyde d'aluminium Phosphate d'aluminium	Utiliser dans plus de 80 % des vaccins licencés pour l'homme Augmente la durée de contact entre l'antigène et les DCs Active l'inflammasome NLRP3	Th2
Emulsion eau dans huile	Adjuvant de Freund Titermax Montanide	Induit une forte réponse inflammatoire Augmente la durée de persistance de l'antigène	Th1 et Th2
Emulsion huile dans eau	MF 59 Ribi	Induction d'une réponse inflammatoire Augmente le recrutement et l'activation des CPA Augmente la production d'anticorps, la prolifération des cellules T et induit la production de cellules T cytotoxiques	Th1 et Th2
Mono-phosphoryl lipide A (MPL)	Fraction bactérienne issue de la détoxification du LPS	Activation du TLR4	Th1
CpG ODN	3 classes de CpG qui activent préférentiellement les cellules B, les cellules NK ou les DCs	Activation du TLR9	Th1
Flagelline	Flagelline de <i>S. typhimurium</i>	Activation du TLR5	Th1 et Th2
Toxines bactériennes et dérivées	CT (cholera toxin) LT	Non identifié	Th2, production d'IgA
ISCOM (Immunostimulating Complexes)	ISCOM ICOMATRIX	Augmente l'expression du CMHII sur les CPA d'où une augmentation de la présentation de l'antigène	Th1 et Th2
Saponaire	QuilA QS21	Augmente la présentation de l'antigène Induit la production de cellules T cytotoxiques	Th1
Dérivé d'imidazoquinoline	Imiquimod	Activation du TLR7 et du TLR8 Induit la production de cytokines (en particulier l'INF- $\alpha$ )	Th1
Virosome	Influerza Hépatite A	Véhicule permettant de délivrer l'antigène	Th1

D'après (Coffman et al., 2010; Leroux-Roels, 2010; Tritto et al., 2009)

## **APPENDICE B**

### **ARTICLE SCIENTIFIQUE**

#### **ASPECTS MOLÉCULAIRES ET BIOLOGIQUES DES ARTÉRIVIRUS**

**Elodie Roques, Wilfried Saron, Sabrina Peiro et Denis Archambault**

Département des Sciences Biologiques,  
Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

**Article revue publié dans *Virologie*, 2010, 14 (6) : 423-433**

#### **Résumé :**

Les artérivirus forment un groupe de petits virus enveloppés avec un génome composé d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive avec la présence d'une structure chapeau en 5' et d'une queue polyadénylée en 3'. Ces virus appartiennent à la famille Arteriviridae qui, avec les familles Coronaviridae et Roniviridae, constitue l'ordre Nidovirales. Les artérivirus ont un tropisme particulier pour les macrophages et induisent des infections persistantes. Divers travaux ont permis de mieux comprendre l'organisation génomique de ces virus et leurs modes de réplication et de transcription, incluant la synthèse d'ARNm viraux sous-génomiques pour la production des protéines virales structurales. De nombreuses séquences sont maintenant disponibles pour ces virus. De plus, des études portant sur la modulation de la réponse immunitaire innée par les artérivirus démontrent le rôle de plus en plus important des protéines virales non structurales dans ce processus. Finalement, certains mécanismes pro et anti-apoptotiques des artérivirus ont été élucidés mais leurs rôles dans la pathogenèse virale restent à déterminer.

**Mots clés :** artérivirus, réplication, transcription, immunité innée, apoptose



## APPENDICE C

### PARTICIPATIONS À DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES

Résumé pour le « *International PRRS symposium 2008* », Chicago, USA, 5-6  
Décembre 2008 (présentation par poster)

#### EXPRESSION OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS GP5 AND M STRUCTURAL PROTEINS FROM REPLICATING BUT NONDISSEMINATING ADENOVIRUS VECTORS

E. Roques<sup>1\*</sup>, W. Saron<sup>1</sup>, M.-C. St-Louis<sup>1</sup>, B. Massie<sup>2,5</sup>, C. A. Gagnon<sup>3,5</sup>, M. Lessard<sup>4,5</sup>, D.  
Archambault<sup>1,5</sup>.

<sup>1</sup>Dept. of Biological Sciences., University of Québec at Montréal, Qc, Canada;

<sup>2</sup>Biotechnology Research Institute, Montréal, Qc, Canada; <sup>3</sup>Dept. of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, St-Hyacinthe, Qc, Canada; <sup>4</sup>Agriculture Agri-Food Canada, Dairy and Swine Research and Development Centre, Lennoxville, Qc, Canada;

<sup>5</sup>Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), St-Hyacinthe, Qc, Canada.

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is responsible for severe economic losses in infected pig herds worldwide. PRRSV is a member of the genus *Arterivirus*, family *Arteriviridae*, order *Nidovirales*. The current commercial PRRSV vaccines are incompletely effective in protection against PRRSV. Therefore, novel immunization strategies are needed to adequately stimulate the host immune system to ensure protection against PRRSV. As a first step towards this goal, we selected to use novel Adenovirus vectors to express the envelope GP5 protein to which the major neutralizing activity is associated, either alone or in fusion with the matrix M protein (M-GP5), known to enhance the neutralization-inducing activity of GP5. The DNA synthetic encoding-sequences were codon usage-optimized to achieve optimal expression. They were then used to generate replicating but nondisseminating regulated human adenovirus type 5 recombinant vectors (AdVs) by using the cumate operator system capable of expressing the proteins of interest. Immunofluorescence and Western Blot analyses performed using specific anti-GP5 and/or anti-M antibodies confirmed that both GP5 and M-GP5 proteins were successfully expressed in cells infected with the AdVs. Experiments are underway to determine the capability of the AdVs to induce PRRSV-specific immune responses in animals.

This work was subsidized by NSERC, FPPQ, CDAQ.

Résumé pour le « 89th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease », Chicago, USA, 7-8 Décembre 2008 (présentation par poster)

## EXPRESSION OF PRRSV GP5 AND M STRUCTURAL PROTEINS FROM REPLICATING BUT NONDISSEMINATING ADENOVIRUS VECTORS

E. Roques<sup>1\*</sup>, W. Saron<sup>1</sup>, M.-C. St-Louis<sup>1</sup>, B. Massie<sup>2,5</sup>, C. A. Gagnon<sup>3,5</sup>, M. Lessard<sup>4,5</sup>, D. Archambault<sup>1,5</sup>.

<sup>1</sup>Dept. of Biological Sciences., University of Québec at Montréal, Qc, Canada.

<sup>2</sup>Biotechnology Research Institute, Montréal, Qc, Canada. <sup>3</sup>Dept. of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, St-Hyacinthe, Qc, Canada. <sup>4</sup>Agriculture Agri-Food Canada, Dairy and Swine Research and Development Centre, Lennoxville, Qc, Canada.

<sup>5</sup>Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), St-Hyacinthe, Qc, Canada.

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is responsible for severe economic losses in infected pig herds worldwide. PRRSV is a member of the genus *Arterivirus*, family *Arteriviridae*, order *Nidovirales*. The current commercial PRRSV vaccines are incompletely effective in protection against PRRSV. Therefore, novel immunization strategies are needed to adequately stimulate the host immune system to ensure protection against PRRSV. As a first step towards this goal, we selected to use novel Adenovirus vectors to express the envelope GP5 protein to which the major neutralizing activity is associated, either alone or in fusion with the matrix M protein (M-GP5), known to enhance the neutralization-inducing activity of GP5. The DNA synthetic encoding-sequences were codon usage-optimized to achieve optimal expression. They were then used to generate replicating but non-disseminating regulated human adenovirus type 5 recombinant vectors (AdVs) by using the cumate operator system capable of expressing the proteins of interest. Immunofluorescence and Western Blot analyses performed using specific anti-GP5 and/or anti-M antibodies confirmed that both GP5 and M-GP5 proteins were successfully expressed in cells infected with the AdVs. Experiments are underway to study the capability of the AdVs to induce PRRSV-specific immune responses in animals.

This work was subsidized by NSERC, FPPQ, CDAQ.

Résumé pour le *Congrès Armand-Frappier*, Bromont, QC, CANADA,  
5-7 Novembre 2009 (présentation par poster)

**DÉVELOPPEMENT DE VECTEURS VACCINAUX À BASE  
D'ADÉNOVIRUS RECOMBINANTS POUR LE CONTRÔLE DU VIRUS DU  
SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE PORCIN**

E. Roques<sup>1</sup>, W. Saron<sup>1</sup>, M.-C. St-Louis<sup>1</sup>, B. Massie<sup>2,5</sup>, C. A. Gagnon<sup>3,5</sup>, M. Lessard<sup>4,5</sup>, D.  
Archambault<sup>1,5</sup>.

<sup>1</sup>Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Qc, Canada;

<sup>2</sup>Institut de Recherche en Biotechnologie, Montréal, Qc, Canada; <sup>3</sup>Département de pathologie et de microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, St-Hyacinthe, Qc, Canada; <sup>4</sup>Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc, Lennoxville, Qc, Canada;

<sup>5</sup>Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), St-Hyacinthe, Qc, Canada.

Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV) est responsable de pertes économiques très importantes dans l'industrie porcine. À l'heure actuelle, les vaccins commerciaux disponibles permettent seulement une protection partielle contre le PRRSV. Cette étude, basée sur l'induction d'une immunité mucosale et systémique, propose une alternative aux procédures vaccinales utilisées jusqu'à présent. Des adénovecteurs réplcatifs mais non disséminatifs ont été générés afin de produire des protéines d'intérêt. Ces protéines sont la glycoprotéine d'enveloppe GP5, connue pour induire une réponse en anticorps neutralisants, en fusion ou non avec la protéine de matrice M (M:GP5), connue pour augmenter l'activité neutralisante de la GP5. Une fusion entre la protéine M et une variante de la GP5 (M:GP5m) a été aussi générée. Un essai préliminaire d'immunisation chez des porcelets a été réalisé. Les adénovecteurs exprimant les protéines de choix ont été administrés simultanément par voie nasale et intramusculaire. Une analyse par ELISA des anticorps spécifiques dirigés contre la GP5 présents dans le sérum a permis de démontrer que les adénovecteurs exprimant les protéines M:GP5 et M:GP5m permettaient d'induire une bonne réponse en anticorps. Cette réponse était meilleure et plus rapide dans le cas des immunisations réalisées avec la M:GP5m. Des analyses supplémentaires sont en cours afin de caractériser la réponse en anticorps neutralisants ainsi que la réponse mucosale induite.

Résumé pour le 6<sup>ième</sup> Congrès *BIOMED*, Montréal, QC, CANADA,  
28-29 Avril 2010 (présentation par poster)

**DÉVELOPPEMENT DE VACCINS BIVALENTS POUR LE CONTRÔLE DU  
SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE DU PORC ET LA  
PNEUMONIE ENZOOTIQUE DU PORC**

E. Roques<sup>1</sup>, M.-C. St-Louis<sup>1</sup>, C. A. Gagnon<sup>2,3</sup> et D. Archambault<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Dépt. des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Qc, Canada;

<sup>2</sup>Dépt. de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, St-Hyacinthe, Qc, Canada;

<sup>3</sup>Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), St-Hyacinthe, Qc, Canada.

Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV) est responsable de pertes économiques très importantes dans l'industrie porcine. À l'heure actuelle, les vaccins commerciaux disponibles permettent seulement une protection partielle contre le PRRSV. Parmi les autres pathogènes d'importance chez le porc se retrouve *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*), l'agent causal de la pneumonie enzootique. Ce pathogène est reconnu pour augmenter la sévérité et la durée des troubles respiratoires lors d'une co-infection avec le PRRSV. L'objectif du projet est de développer des vecteurs vaccinaux bivalents exprimant des protéines d'intérêt en fusion afin d'induire une protection optimale contre ces pathogènes porcins. Pour réaliser un tel objectif, nous avons généré des adénovecteurs exprimant des protéines en fusion ciblant la glycoprotéine d'enveloppe GP5 du PRRSV et la protéine d'adhésion P97 de *M. hyopneumoniae*. Une analyse par Western Blot et immunofluorescence a permis de confirmer l'expression des différentes protéines sur des cellules infectées par les adénovecteurs. Un essai préliminaire d'immunisation chez la souris a été réalisé. Une analyse par ELISA des anticorps spécifiques dirigés contre la GP5 et la P97 présents dans le sérum a permis de démontrer que les adénovecteurs exprimant la protéine de fusion P97:GP5 permettaient d'induire une bonne réponse en anticorps. Des analyses supplémentaires sont en cours afin de caractériser plus amplement la réponse humorale induite. Les résultats pourraient résulter en une approche vaccinale toute nouvelle pour lutter contre des pathogènes porcins importants au Québec.



Résumé pour le 3<sup>ième</sup> congrès du Centre de Recherche en Infectiologie Porcine  
dans le cadre du congrès de l'ACFAS, Montréal, QC, CANADA,  
10 Mai 2010 (présentation par poster)

## DÉVELOPPEMENT DE VACCINS CHIMERIQUES BIVALENTS DANS LA LUTTE CONTRE LES INFECTIONS PORCINES MIXTES

E. Roques<sup>1</sup>, M.-C. St-Louis<sup>1</sup>, C. A. Gagnon<sup>2,3</sup> et D. Archambault<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Dépt. des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Qc, Canada; <sup>2</sup>Dépt. de Pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, St-Hyacinthe, Qc, Canada; <sup>3</sup>Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), St-Hyacinthe, Qc, Canada.

Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV) est responsable de pertes économiques très importantes dans l'industrie porcine. À l'heure actuelle, les vaccins commerciaux disponibles permettent seulement une protection partielle contre le PRRSV. Parmi les autres pathogènes du porc importants au Québec se retrouvent le circovirus porcin de type 2 (PCV2) et *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* (agent de la pneumonie enzootique). Ces deux pathogènes sont reconnus pour augmenter la sévérité et la durée des troubles respiratoires lors d'une co-infection avec le PRRSV. L'objectif du projet est de développer des vecteurs vaccinaux bivalents exprimant des protéines d'intérêt en fusion afin d'induire une protection optimale contre les pathogènes porcins. Pour réaliser un tel objectif, nous avons généré des adénovecteurs exprimant des protéines en fusion ciblant la glycoprotéine d'enveloppe GP5 du PRRSV, la protéine de la capsid (Cap) du PCV2b et la protéine d'adhésion P97 de *M. hyopneumoniae*. Une analyse par Western Blot et immunofluorescence a permis de confirmer l'expression des différentes protéines sur des cellules infectées par les adénovecteurs. Des essais d'immunisation chez la souris sont actuellement en cours. Les résultats pourraient résulter en une approche vaccinale toute nouvelle pour lutter contre des pathogènes porcins importants au Québec.

Supporté par le CRIP (programme Nouvelles Initiatives)

Résumé pour le 7<sup>ième</sup> Congrès BIOMED, Montréal, QC, CANADA,  
27-28 Avril 2011 (présentation par poster)

## DÉVELOPPEMENT D'ADÉNOVECTEURS RECOMBINANTS À DES FINS VACCINALES POUR PRÉVENIR LES INFECTIONS PORCINES MIXTES

E. Roques<sup>1</sup>, M.-C. St-Louis<sup>1</sup>, A. Girard<sup>1</sup>, W. Saron<sup>1</sup>, B. Massie<sup>2,3</sup>, C. A. Gagnon<sup>3,4</sup> et  
D. Archambault<sup>1,3,5</sup>

<sup>1</sup>Dépt. des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Qc ; <sup>2</sup> Institut de Recherche de Biotechnologie, Montréal, Qc ; <sup>3</sup>Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), St-Hyacinthe, Qc; <sup>4</sup>Dépt. de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, St-Hyacinthe, Qc ; <sup>5</sup>Centre de recherche Biomed et PhamaQAM, Qc.

Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV), le circovirus porcin (PCV) et *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* sont des pathogènes fréquemment retrouvés dans les élevages porcins. De nombreuses études ont démontré que la pathologie développée chez les porcs lors de l'infection par l'un ou l'autre de ces agents infectieux est aggravée dans la cadre d'infections mixtes. A l'heure actuelle, il existe différents vaccins commerciaux spécifiques à chacune des maladies, mais aucun vaccin multivalent n'a été développé contre ces pathogènes. L'objectif du projet est de développer des vecteurs vaccinaux bivalents exprimant des protéines d'intérêt en fusion afin d'induire une protection optimale contre ces différents pathogènes porcins. Pour réaliser un tel objectif, nous avons généré des adénovecteurs (AdVs) exprimant des protéines en fusion ciblant la glycoprotéine d'enveloppe GP5 du PRRSV, la protéine de la capsid (Cap) du PCV2b et la protéine d'adhésion P97 de *M. hyopneumoniae*. Une analyse par Western Blot a permis de confirmer l'expression des différentes protéines sur des cellules infectées par les AdVs. Des essais d'immunisation chez la souris ont ensuite montré la capacité des AdVs à induire une réponse humorale contre les différentes protéines d'intérêt. De plus, la fusion des protéines Cap ou GP5 à la protéine P97 permettent de générer une meilleure réponse contre ces antigènes.

Financé par le CRIP (Nouvelles Initiatives)

Résumé pour le 4<sup>ième</sup> congrès du Centre de Recherche en Infectiologie Porcine  
Saint-Hyacinthe, QC, CANADA,  
30-31 Mai 2011 (présentation par poster)

**DÉVELOPPEMENT DE VECTEURS VACCINAUX À BASE  
D'ADÉNOVIRUS RECOMBINANTS POUR LE CONTRÔLE  
D'INFECTIONS PORCINES MIXTES**

E. Roques<sup>1</sup>, M.-C. St-Louis<sup>1</sup>, A. Girard<sup>1</sup>, W. Saron<sup>1</sup>, B. Massie<sup>2,3</sup>, C. A. Gagnon<sup>3,4</sup> et  
D. Archambault<sup>1,3,5</sup>

<sup>1</sup>Dépt. des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Qc, Canada; <sup>2</sup> Institut de Recherche de Biotechnologie, Montréal, Qc, Canada; <sup>3</sup>Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), St-Hyacinthe, Qc, Canada; <sup>4</sup>Dépt. de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, St-Hyacinthe, Qc, Canada; <sup>5</sup>Centre de recherche Biomed et PharmaQAM, Qc, Canada.

Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV), le circovirus porcin (PCV) et *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* sont des pathogènes fréquemment retrouvés dans les élevages porcins. De nombreuses études ont démontré que la pathologie développée chez les porcs lors de l'infection par l'un ou l'autre de ces agents infectieux est aggravée dans le cadre d'infections mixtes. A l'heure actuelle, il existe différents vaccins commerciaux spécifiques à chacune des maladies, mais aucun vaccin multivalent n'a été développé contre ces pathogènes. L'objectif du projet est de développer des vecteurs vaccinaux bivalents exprimant des protéines d'intérêt en fusion afin d'induire une protection optimale contre ces différents pathogènes porcins. Pour réaliser un tel objectif, nous avons généré des adénovecteurs (AdVs) exprimant des protéines en fusion ciblant la glycoprotéine d'enveloppe GP5 du PRRSV, la protéine de la capsid (Cap) du PCV2b et la protéine d'adhésion P97 de *M. hyopneumoniae*. Une analyse par Western Blot a permis de confirmer l'expression des différentes protéines sur des cellules infectées par les AdVs. Des essais d'immunisation chez la souris ont ensuite montré la capacité des AdVs à induire une réponse humorale contre les différentes protéines d'intérêt. De plus, la fusion des protéines Cap ou GP5 à la protéine P97 permettent de générer une meilleure réponse contre ces antigènes.

Financé par le CRIP (Nouvelles Initiatives)



Résumé pour le 4<sup>ième</sup> congrès du Centre de Recherche en Infectiologie Porcine  
Saint-Hyacinthe, QC, CANADA,  
30-31 Mai 2011 (présentation orale)

**RÉPONSE IMMUNITAIRE SPÉCIFIQUE CHEZ DES PORCS VACCINÉS  
AVEC DES ADÉNOVECTEURS RECOMBINANTS POUR LE CONTRÔLE  
DU VIRUS DU SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE  
PORCIN**

E. Roques<sup>1</sup>, M.-C. St-Louis<sup>1</sup>, W. Saron<sup>1</sup>, A. Girard<sup>1</sup>, B. Massie<sup>2,3</sup>, C. A. Gagnon<sup>3,4</sup>, M.  
Lessard<sup>3,5</sup>, D. Archambault<sup>1,3,5</sup>.

<sup>1</sup>Dépt. des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Qc; <sup>2</sup>Institut de Recherche de Biotechnologie, Montréal, Qc; <sup>3</sup>Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), St-Hyacinthe, Qc; <sup>4</sup>Dépt. de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, St-Hyacinthe, Qc; <sup>5</sup>Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc, Lennoxville, Qc; <sup>6</sup>Centre de recherche Biomed et PharmaQAM, Montréal, Qc.

Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV) est responsable de pertes économiques très importantes dans l'industrie porcine. À l'heure actuelle, les vaccins commerciaux disponibles permettent seulement une protection partielle. Dans cette étude, des adénovecteurs (AdVs) réplikatifs mais non disséminatifs exprimant les protéines d'intérêt M-GP5, M-GP5m (mutation de la protéine GP5) ont été générés. Deux groupes de porcelets ont été immunisés à 3 semaines d'intervalle avec ces AdVs par voies intramusculaire et intranasale. Trois groupes additionnels ont été immunisés avec un AdV exprimant la GFP (témoin négatif), l'AdV M-GP5m suivi d'un rappel avec la protéine recombinante GP5 ou le vaccin Ingelvac® PRRSV MLV inactivé. Le suivi de la réponse immunitaire a montré la capacité des AdVs à induire une réponse humorale et mucoale spécifique chez les porcs immunisés et l'utilisation de l'AdV M-GP5m suivi d'un rappel avec la protéine a permis de générer la meilleure réponse humorale. Une infection expérimentale a ensuite été réalisée. Les porcs préalablement immunisés avec les AdVs ont développé une protection partielle contre l'infection. Les meilleurs degrés de protection furent obtenus chez les porcs immunisés avec les AdVs exprimant la M-GP5m ou avec le vaccin commercial inactivé.

Financé par le CRSNG, la FPPQ, le CDAQ et Agriculture et Agroalimentaire Canada (PPFI).



Résumé pour le 3<sup>ème</sup> congrès Pharmaqam, Montréal, QC, CANADA,  
2 Juin 2011 (présentation par poster)

**EFFET MODULATEUR DE LA PROTÉINE D'ADHÉSION P97 DE  
*MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* SUR LA RÉPONSE HUMORALE DANS  
LE CADRE DE DÉVELOPPEMENT DE VACCINS POUR LA LUTTE  
CONTRE LES INFECTIONS PORCINES MIXTES.**

E. Roques<sup>1</sup>, M.-C. St-Louis<sup>1</sup>, A. Girard<sup>1</sup>, W. Saron<sup>1</sup>, B. Massie<sup>2,3</sup>, C. A. Gagnon<sup>3,4</sup> et  
D. Archambault<sup>1,3,5</sup>

<sup>1</sup>Dépt. des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Qc; <sup>2</sup> Institut de Recherche de Biotechnologie, Montréal, Qc; <sup>3</sup>Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), St-Hyacinthe; <sup>4</sup>Dépt. de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, St-Hyacinthe, Qc; <sup>5</sup>Centre de recherche Biomed et PhamaQAM, Qc.

Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV), le circovirus porcin (PCV) et *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* sont des pathogènes fréquemment retrouvés dans les élevages porcins. De nombreuses études ont démontré que la pathologie développée chez les porcs lors de l'infection par l'un ou l'autre de ces agents infectieux est aggravée dans le cadre d'infections mixtes. A l'heure actuelle, il existe différents vaccins commerciaux spécifiques à chacune des maladies, mais aucun vaccin multivalent n'a été développé contre ces pathogènes. L'objectif du projet est de développer des vecteurs vaccinaux bivalents exprimant des protéines d'intérêt en fusion afin d'induire une protection optimale contre ces différents pathogènes porcins. Pour réaliser un tel objectif, nous avons généré des adénovecteurs exprimant des protéines en fusion ciblant la glycoprotéine d'enveloppe GP5 du PRRSV, la protéine de la capsid (Cap) du PCV2b et la protéine d'adhésion P97 de *M. hyopneumoniae*. Une analyse par Western Blot a permis de confirmer l'expression des différentes protéines sur des cellules infectées par les adénovecteurs. Des essais d'immunisation chez la souris ont ensuite montré la capacité des AdVs à induire une réponse humorale contre les différentes protéines d'intérêt. De plus, la fusion des protéines Cap ou GP5 à la protéine P97 a permis de générer une meilleure réponse en anticorps contre ces antigènes, suggérant un effet adjuvant de la P97. Des expériences sont en cours afin de déterminer si la P97 exerce un effet immunomodulateur via l'activation de la réponse immunitaire innée.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aasted, B., Bach, P., Nielsen, J., et Lind, P. (2002). Cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells and lymph node cells from piglets infected in utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**(6), 1229-1234.
- Adams, C., Pitzer, J., et Minion, F. C. (2005). In vivo expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun* **73**(11), 7784-7787.
- Aguilar, J. C., et Rodriguez, E. G. (2007). Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* **25**(19), 3752-3762.
- Ahn, K. K., Kwon, D., Jung, K., Ha, Y., Seo, M. J., Kim, S. H., Kim, M. Y., Cho, K. D., Lee, B. H., et Chae, C. (2009). Identification of interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 expression in lungs from pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by in situ hybridization. *J Vet Med Sci* **71**(4), 441-445.
- Albina, E. (1997a). Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Vet Microbiol* **55**(1-4), 309-316.
- Albina, E. (1997b). Porcine reproductive and respiratory syndrome: ten years of experience (1986-1996) with this undesirable viral infection. *Vet Res* **28**(4), 305-352.
- Albina, E., Carrat, C., et Charley, B. (1998a). Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Interferon Cytokine Res* **18**(7), 485-490.
- Albina, E., Madec, F., Cariolet, R., et Torrison, J. (1994). Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *Vet Rec* **134**(22), 567-573.
- Albina, E., Piriou, L., Hutet, E., Cariolet, R., et L'Hospitalier, R. (1998b). Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Immunol Immunopathol* **61**(1), 49-66.
- Alexander, J., del Guercio, M. F., Maewal, A., Qiao, L., Fikes, J., Chesnut, R. W., Paulson, J., Bundle, D. R., DeFrees, S., et Sette, A. (2000). Linear PADRE T helper epitope and carbohydrate B cell epitope conjugates induce specific high titer IgG antibody responses. *J Immunol* **164**(3), 1625-1633.
- Alexander, J., Sidney, J., Southwood, S., Ruppert, J., Oseroff, C., Maewal, A., Snoke, K., Serra, H. M., Kubo, R. T., Sette, A., et al. (1994). Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. *Immunity* **1**(9), 751-761.

- Allan, G. M., Caprioli, A., McNair, I., Lagan-Tregaskis, P., Ellis, J., Krakowka, S., McKillen, J., Ostanello, F., et McNeilly, F. (2007). Porcine circovirus 2 replication in colostrum-deprived piglets following experimental infection and immune stimulation using a modified live vaccine against porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Zoonoses Public Health* **54**(5), 214-222.
- Allan, G. M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J. C., Ellis, J. A., Krakowka, S. J., Meehan, B. M., et Adair, B. M. (1999). Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* **121**(1), 1-11.
- Allan, G. M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Walker, I., et Kennedy, S. (2000a). Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol* **145**(11), 2421-2429.
- Allan, G. M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clarke, E. G., Ellis, J. A., Haines, D. M., Meehan, B. M., et Adair, B. M. (1998). Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* **10**(1), 3-10.
- Allan, G. M., McNeilly, F., Kennedy, S., Meehan, B., Ellis, J., et Krakowka, S. (2000b). Immunostimulation, PCV-2 and PMWS. *Vet Rec* **147**(6), 170-171.
- Allende, R., Laegreid, W. W., Kutish, G. F., Galeota, J. A., Wills, R. W., et Osorio, F. A. (2000). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol* **74**(22), 10834-10837.
- An, D. J., Song, D. S., et Park, B. K. (2008). Systemic cytokine profiles of mice vaccinated with naked DNAs encoding six open reading frame antigens of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Res Vet Sci* **85**(3), 503-509.
- Ansari, I. H., Kwon, B., Osorio, F., et Pattnaik, A. K. (2006a). Involvement of cysteine residue(s) within the M protein of PRRSV in infectious virion production. In "International PRRS Symposium", Chicago.
- Ansari, I. H., Kwon, B., Osorio, F. A., et Pattnaik, A. K. (2006b). Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J Virol* **80**(8), 3994-4004.
- Asai, T., Okada, M., Ono, M., Irisawa, T., Mori, Y., Yokomizo, Y., et Sato, S. (1993). Increased levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol* **38**(3-4), 253-260.
- Asai, T., Okada, M., Ono, M., Mori, Y., Yokomizo, Y., et Sato, S. (1994). Detection of interleukin-6 and prostaglandin E2 in bronchoalveolar lavage fluids of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol* **44**(1), 97-102.



- Balasuriya, U. B., Heidner, H. W., Hedges, J. F., Williams, J. C., Davis, N. L., Johnston, R. E., et MacLachlan, N. J. (2000). Expression of the two major envelope proteins of equine arteritis virus as a heterodimer is necessary for induction of neutralizing antibodies in mice immunized with recombinant Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *J Virol* **74**(22), 10623-10630.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., et Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811.
- Bandrick, M., Pieters, M., Pijoan, C., et Molitor, T. W. (2008). Passive transfer of maternal *Mycoplasma hyopneumoniae*-specific cellular immunity to piglets. *Clin Vaccine Immunol* **15**(3), 540-543.
- Barfoed, A. M., Blixenkrone-Moller, M., Jensen, M. H., Botner, A., et Kamstrup, S. (2004). DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. *Vaccine* **22**(27-28), 3628-3641.
- Bassaganya-Riera, J., Thacker, B. J., Yu, S., Strait, E., Wannemuehler, M. J., et Thacker, E. L. (2004). Impact of immunizations with porcine reproductive and respiratory syndrome virus on lymphoproliferative recall responses of CD8+ T cells. *Viral Immunol* **17**(1), 25-37.
- Bastos, R. G., Dellagostin, O. A., Barletta, R. G., Doster, A. R., Nelson, E., Zuckermann, F., et Osorio, F. A. (2004). Immune response of pigs inoculated with *Mycobacterium bovis* BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* **22**(3-4), 467-474.
- Batista, L., Pijoan, C., Dee, S., Olin, M., Molitor, T., Joo, H. S., Xiao, Z., et Murtaugh, M. (2004). Virological and immunological responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of gilts. *Can J Vet Res* **68**(4), 267-273.
- Bautista, E. M., Faaberg, K. S., Mickelson, D., et McGruder, E. D. (2002). Functional properties of the predicted helicase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* **298**(2), 258-270.
- Bautista, E. M., et Molitor, T. W. (1997). Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Viral Immunol* **10**(2), 83-94.
- Bautista, E. M., Suarez, P., et Molitor, T. W. (1999). T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* **144**(1), 117-134.
- Belyakov, I. M., et Ahlers, J. D. (2009). What role does the route of immunization play in the generation of protective immunity against mucosal pathogens? *J Immunol* **183**(11), 6883-6892.



- Benfield, D. A., Nelson, E., Collins, J. E., Harris, L., Goyal, S. M., Robison, D., Christianson, W. T., Morrison, R. B., Gorcyca, D., et Chladek, D. (1992). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 4(2), 127-133.
- Beura, L. K., Sarkar, S. N., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattnaik, A. K., et Osorio, F. A. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1 beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *J Virol* 84(3), 1574-1584.
- Blanchard, P., Mahe, D., Cariolet, R., Keranflec'h, A., Baudouard, M. A., Cordioli, P., Albina, E., et Jestin, A. (2003). Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine* 21(31), 4565-4575.
- Bloemraad, M., de Kluijver, E. P., Petersen, A., Burkhardt, G. E., et Wensvoort, G. (1994). Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs. *Vet Microbiol* 42(4), 361-371.
- Bogema, D. R., Deutscher, A. T., Woolley, L. K., Seymour, L. M., Raymond, B. B., Tacchi, J. L., Padula, M. P., Dixon, N. E., Minion, F. C., Jenkins, C., Walker, M. J., et Djordjevic, S. P. (2012). Characterization of Cleavage Events in the Multifunctional Cilium Adhesin Mhp684 (P146) Reveals a Mechanism by Which Mycoplasma hyopneumoniae Regulates Surface Topography. *MBio* 3(2).
- Bourbeau, D., Lau, C. J., Jaime, J., Koty, Z., Zehntner, S. P., Lavoie, G., Mes-Masson, A. M., Nalbantoglu, J., et Massie, B. (2007). Improvement of antitumor activity by gene amplification with a replicating but nondisseminating adenovirus. *Cancer Res* 67(7), 3387-3395.
- Boyden, E. D., et Dietrich, W. F. (2006). Nalplb controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* 38(2), 240-244.
- Braga, C. J., Massis, L. M., Sbragio-Almeida, M. E., Alencar, B. C., Bargieri, D. Y., Boscardin, S. B., Rodrigues, M. M., et Ferreira, L. C. (2010). CD8+ T cell adjuvant effects of Salmonella FliCd flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. *Vaccine* 28(5), 1373-1382.
- Brown, E., Lawson, S., Welbon, C., Gnanandarajah, J., Li, J., Murtaugh, M. P., Nelson, E. A., Molina, R. M., Zimmerman, J. J., Rowland, R. R., et Fang, Y. (2009). Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV types I and II. *Clin Vaccine Immunol* 16(5), 628-635.
- Broz, P., Newton, K., Lamkanfi, M., Mariathasan, S., Dixit, V. M., et Monack, D. M. (2010). Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella. *J Exp Med* 207(8), 1745-1755.
- Brunner, R., Jensen-Jarolim, E., et Pali-Scholl, I. (2010). The ABC of clinical and experimental adjuvants--a brief overview. *Immunol Lett* 128(1), 29-35.

- Bucarey, S. A., Noriega, J., Reyes, P., Tapia, C., Saenz, L., Zuniga, A., et Tobar, J. A. (2009). The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts. *Vaccine* **27**(42), 5781-5790.
- Burnett, T. A., Dinkla, K., Rohde, M., Chhatwal, G. S., Uphoff, C., Srivastava, M., Cordwell, S. J., Geary, S., Liao, X., Minion, F. C., Walker, M. J., et Djordjevic, S. P. (2006). P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. *Mol Microbiol* **60**(3), 669-686.
- Cai, J. P., Wang, Y. D., Tse, H., Xiang, H., Yuen, K. Y., et Che, X. Y. (2009). Detection of asymptomatic antigenemia in pigs infected by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by a novel capture immunoassay with monoclonal antibodies against the nucleocapsid protein of PRRSV. *Clin Vaccine Immunol* **16**(12), 1822-1828.
- Calsamiglia, M., Fraile, L., Espinal, A., Cuxart, A., Seminati, C., Martin, M., Mateu, E., Domingo, M., et Segales, J. (2007). Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Res Vet Sci* **82**(3), 299-304.
- Cancel-Tirado, S. M., Evans, R. B., et Yoon, K. J. (2004). Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* **102**(3), 249-262.
- Cao, J., Wang, X., Du, Y., Li, Y., et Jiang, P. (2010). CD40 ligand expressed in adenovirus can improve the immunogenicity of the GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Vaccine* **28**(47), 7514-7522.
- Caruso, J. P., et Ross, R. F. (1990). Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. *Am J Vet Res* **51**(2), 227-231.
- Cavanagh, D. (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* **142**(3), 629-633.
- Chae, C. (2005). A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J* **169**(3), 326-336.
- Chae, C. (2011). Vaccinating pigs against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection: failure to prevent transmission. *Vet J* **188**(1), 7-8.
- Chang, H. C., Peng, Y. T., Chang, H. L., Chaung, H. C., et Chung, W. B. (2008). Phenotypic and functional modulation of bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* **129**(3-4), 281-293.
- Chang, H. W., Jeng, C. R., Lin, T. L., Liu, J. J., Chiou, M. T., Tsai, Y. C., Chia, M. Y., Jan, T. R., et Pang, V. F. (2006). Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation. *Vet Immunol Immunopathol* **110**(3-4), 207-219.

- Charerntantanakul, W. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. *World Journal of Virology* **1**(1), 23-30.
- Charerntantanakul, W., Platt, R., Johnson, W., Roof, M., Vaughn, E., et Roth, J. A. (2006). Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* **109**(1-2), 99-115.
- Chen, A. Y., Fry, S. R., Daggard, G. E., et Mukkur, T. K. (2008). Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. *Vaccine* **26**(34), 4372-4378.
- Chen, A. Y., Fry, S. R., Forbes-Faulkner, J., Daggard, G., et Mukkur, T. K. (2006a). Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. *J Med Microbiol* **55**(Pt 7), 923-929.
- Chen, J., Liu, T., Zhu, C. G., Jin, Y. F., et Zhang, Y. Z. (2006b). Genetic variation of Chinese PRRSV strains based on ORF5 sequence. *Biochem Genet* **44**(9-10), 425-435.
- Chen, J. R., Lin, J. H., Weng, C. N., et Lai, S. S. (1998). Identification of a novel adhesin-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* **62**(2), 97-110.
- Chen, P. H., Ornelles, D. A., et Shenk, T. (1993). The adenovirus L3 23-kilodalton proteinase cleaves the amino-terminal head domain from cytokeratin 18 and disrupts the cytokeratin network of HeLa cells. *J Virol* **67**(6), 3507-3514.
- Chen, W., Patel, G. B., Yan, H., et Zhang, J. (2010a). Recent advances in the development of novel mucosal adjuvants and antigen delivery systems. *Hum Vaccin* **6**(9).
- Chen, X., et Liu, J. (2011). Generation and immunogenicity of transgenic potato expressing the GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol Methods* **173**(1), 153-158.
- Chen, Y. L., Wang, S. N., Yang, W. J., Chen, Y. J., Lin, H. H., et Shiuan, D. (2003). Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infect Immun* **71**(3), 1155-1160.
- Chen, Z., Lawson, S., Sun, Z., Zhou, X., Guan, X., Christopher-Hennings, J., Nelson, E. A., et Fang, Y. (2010b). Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nspl) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nspl function as interferon antagonist. *Virology* **398**(1), 87-97.
- Cheung, A. K. (2004). Palindrome regeneration by template strand-switching mechanism at the origin of DNA replication of porcine circovirus via the rolling-circle melting-pot replication model. *J Virol* **78**(17), 9016-9029.
- Cheung, A. K. (2005). Detection of rampant nucleotide reversion at the origin of DNA replication of porcine circovirus type 1. *Virology* **333**(1), 22-30.

- Chia, M. Y., Hsiao, S. H., Chan, H. T., Do, Y. Y., Huang, P. L., Chang, H. W., Tsai, Y. C., Lin, C. M., Pang, V. F., et Jeng, C. R. (2010). The immunogenicity of DNA constructs co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus conjugated by GPGP linker in pigs. *Vet Microbiol* **146**(3-4), 189-199.
- Chia, M. Y., Hsiao, S. H., Chan, H. T., Do, Y. Y., Huang, P. L., Chang, H. W., Tsai, Y. C., Lin, C. M., Pang, V. F., et Jeng, C. R. (2011). Evaluation of the immunogenicity of a transgenic tobacco plant expressing the recombinant fusion protein of GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* **140**(3-4), 215-225.
- Cho, J. G., et Dee, S. A. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* **66**(3), 655-662.
- Cho, J. G., Dee, S. A., Deen, J., Guedes, A., Trincado, C., Fano, E., Jiang, Y., Faaberg, K., Collins, J. E., Murtaugh, M. P., et Joo, H. S. (2006). Evaluation of the effects of animal age, concurrent bacterial infection, and pathogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on virus concentration in pigs. *Am J Vet Res* **67**(3), 489-493.
- Cho, J. G., Deen, J., et Dee, S. A. (2007). Influence of isolate pathogenicity on the aerosol transmission of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res* **71**(1), 23-27.
- Choi, C., Cho, W. S., Kim, B., et Chae, C. (2002). Expression of Interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in pigs experimentally infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). *J Comp Pathol* **127**(2-3), 106-113.
- Choi, C., Kwon, D., Jung, K., Ha, Y., Lee, Y. H., Kim, O., Park, H. K., Kim, S. H., Hwang, K. K., et Chae, C. (2006). Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with Mycoplasma hyopneumoniae. *J Comp Pathol* **134**(1), 40-46.
- Christianson, W. T., Choi, C. S., Collins, J. E., Molitor, T. W., Morrison, R. B., et Joo, H. S. (1993). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can J Vet Res* **57**(4), 262-268.
- Coffman, R. L., Sher, A., et Seder, R. A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* **33**(4), 492-503.
- Collins, J. E., Benfield, D. A., Christianson, W. T., Harris, L., Hennings, J. C., Shaw, D. P., Goyal, S. M., McCullough, S., Morrison, R. B., Joo, H. S., et al. (1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* **4**(2), 117-126.



- Conceicao, F. R., Moreira, A. N., et Dellagostin, O. A. (2006). A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine* **24**(29-30), 5734-5743.
- Cruz, J. L., Zuniga, S., Becares, M., Sola, I., Ceriani, J. E., Juanola, S., Plana, J., et Enjuanes, L. (2010). Vectored vaccines to protect against PRRSV. *Virus Res* **154**(1-2), 150-160.
- Damte, D., Lee, S. J., Hwang, M. H., Gebru, E., Choi, M. J., Lee, J. S., Cheng, H., et Park, S. C. (2011). Inflammatory responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* in murine alveolar macrophage cell lines. *N Z Vet J* **59**(4), 185-190.
- Darwich, L., Balasch, M., Plana-Duran, J., Segales, J., Domingo, M., et Mateu, E. (2003). Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *J Gen Virol* **84**(Pt 12), 3453-3457.
- Darwich, L., Diaz, I., et Mateu, E. (2010). Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus Res* **154**(1-2), 123-132.
- Darwich, L., Gimeno, M., Sibila, M., Diaz, I., de la Torre, E., Dotti, S., Kuzemtseva, L., Martin, M., Pujols, J., et Mateu, E. (2011). Genetic and immunobiological diversities of porcine reproductive and respiratory syndrome genotype I strains. *Vet Microbiol* **150**(1-2), 49-62.
- Darwich, L., Segales, J., Domingo, M., et Mateu, E. (2002). Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**(2), 236-242.
- Das, P. B., Dinh, P. X., Ansari, I. H., de Lima, M., Osorio, F. A., et Pattnaik, A. K. (2010). The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163. *J Virol* **84**(4), 1731-1740.
- Das, P. B., Vu, H. L., Dinh, P. X., Cooney, J. L., Kwon, B., Osorio, F. A., et Pattnaik, A. K. (2011). Glycosylation of minor envelope glycoproteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infectious virus recovery, receptor interaction, and immune response. *Virology* **410**(2), 385-394.
- de Lima, M., Pattnaik, A. K., Flores, E. F., et Osorio, F. A. (2006). Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* **353**(2), 410-421.
- Dea, S., Bilodeau, R., Athanassious, R., Sauvageau, R., et Martineau, G. P. (1992). Swine reproductive and respiratory syndrome in Quebec: Isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus. *Can Vet J* **33**(12), 801-808.

- Dea, S., Gagnon, C. A., Mardassi, H., et Milane, G. (1996). Antigenic variability among North American and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as defined by monoclonal antibodies to the matrix protein. *J Clin Microbiol* **34**(6), 1488-1493.
- Dea, S., Gagnon, C. A., Mardassi, H., Pirzadeh, B., et Rogan, D. (2000). Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol* **145**(4), 659-688.
- DeBey, M. C., et Ross, R. F. (1994). Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect Immun* **62**(12), 5312-5318.
- Decroix, N., Quan, C. P., Pamonsinlapatham, P., et Bouvet, J. P. (2002). Mucosal immunity induced by intramuscular administration of free peptides in-line with PADRE: IgA antibodies to the ELDKWA epitope of HIV gp41. *Scand J Immunol* **56**(1), 59-65.
- Dee, S., Otake, S., Oliveira, S., et Deen, J. (2009). Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res* **40**(4), 39.
- Delputte, P. L., Costers, S., et Nauwynck, H. J. (2005). Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *J Gen Virol* **86**(Pt 5), 1441-1445.
- Delputte, P. L., Meerts, P., Costers, S., et Nauwynck, H. J. (2004). Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* **102**(3), 179-188.
- Delputte, P. L., Vanderheijden, N., Nauwynck, H. J., et Pensaert, M. B. (2002). Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J Virol* **76**(9), 4312-4320.
- Delrue, I., Delputte, P. L., et Nauwynck, H. J. (2009). Assessing the functionality of viral entry-associated domains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during inactivation procedures, a potential tool to optimize inactivated vaccines. *Vet Res* **40**(6), 62.
- Deutscher, A. T., Jenkins, C., Minion, F. C., Seymour, L. M., Padula, M. P., Dixon, N. E., Walker, M. J., et Djordjevic, S. P. (2010). Repeat regions R1 and R2 in the P97 paralogue Mhp271 of *Mycoplasma hyopneumoniae* bind heparin, fibronectin and porcine cilia. *Mol Microbiol* **78**(2), 444-458.
- Diaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., et Mateu, E. (2006). Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology* **351**(2), 249-259.

- Diaz, I., Pujols, J., Ganges, L., Gimeno, M., Darwich, L., Domingo, M., et Mateu, E. (2009). In silico prediction and ex vivo evaluation of potential T-cell epitopes in glycoproteins 4 and 5 and nucleocapsid protein of genotype-I (European) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* **27**(41), 5603-5611.
- Djordjevic, S. P., Cordwell, S. J., Djordjevic, M. A., Wilton, J., et Minion, F. C. (2004). Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect Immun* **72**(5), 2791-2802.
- Drexler, C. S., Witvliet, M. H., Raes, M., van de Laar, M., Eggen, A. A., et Thacker, E. L. (2010). Efficacy of combined porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in piglets. *Vet Rec* **166**(3), 70-74.
- Dupont, K., Nielsen, E. O., Baekbo, P., et Larsen, L. E. (2008). Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol* **128**(1-2), 56-64.
- Dwivedi, V., Manickam, C., Patterson, R., Dodson, K., Murtaugh, M., Torrelles, J. B., Schlesinger, L. S., et Renukaradhya, G. J. (2011). Cross-protective immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus by intranasal delivery of a live virus vaccine with a potent adjuvant. *Vaccine* **29**(23), 4058-4066.
- Ellingson, J. S., Wang, Y., Layton, S., Ciacci-Zanella, J., Roof, M. B., et Faaberg, K. S. (2010). Vaccine efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome virus chimeras. *Vaccine* **28**(14), 2679-2686.
- Ellis, J., Spinato, M., Yong, C., West, K., McNeilly, F., Meehan, B., Kennedy, S., Clark, E., Krakowka, S., et Allan, G. (2003). Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar. *J Vet Diagn Invest* **15**(4), 364-368.
- Faaberg, K. S., Hocker, J. D., Erdman, M. M., Harris, D. L., Nelson, E. A., Torremorell, M., et Plagemann, P. G. (2006). Neutralizing antibody responses of pigs infected with natural GP5 N-glycan mutants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol* **19**(2), 294-304.
- Faaberg, K. S., et Plagemann, P. G. (1995). The envelope proteins of lactate dehydrogenase-elevating virus and their membrane topography. *Virology* **212**(2), 512-525.
- Fachinger, V., Bischoff, R., Jedidia, S. B., Saalmuller, A., et Elbers, K. (2008). The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine* **26**(11), 1488-1499.
- Fagan, P. K., Djordjevic, S. P., Eamens, G. J., Chin, J., et Walker, M. J. (1996). Molecular characterization of a ribonucleotide reductase (nrdF) gene fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an experimental vaccine for enzootic pneumonia. *Infect Immun* **64**(3), 1060-1064.

- Fagan, P. K., Walker, M. J., Chin, J., Earnens, G. J., et Djordjevic, S. P. (2001). Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. *Microb Pathog* **30**(2), 101-110.
- Fan, H., Ju, C., Tong, T., Huang, H., Lv, J., et Chen, H. (2007). Immunogenicity of empty capsids of porcine circovirus type 2 produced in insect cells. *Vet Res Commun* **31**(4), 487-496.
- Fang, L., Jiang, Y., Xiao, S., Niu, C., Zhang, H., et Chen, H. (2006). Enhanced immunogenicity of the modified GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Genes* **32**(1), 5-11.
- Fang, Y., et Snijder, E. J. (2010). The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Virus Res* **154**(1-2), 61-76.
- Fano, E., Pijoan, C., et Dee, S. (2005). Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Can J Vet Res* **69**(3), 223-228.
- Faurez, F., Dory, D., Grasland, B., et Jestin, A. (2009). Replication of porcine circoviruses. *Virol J* **6**, 60.
- Feng, Z.-x., Shao, G.-q., Liu, M.-j., Wu, X.-s., Zhou, Y.-q., et Gan, Y. (2010). Immune Responses to the Attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* 168 Strain Vaccine by Intrapulmonic Immunization in Piglets. *Agricultural Sciences in China* **9**(3), 423-431.
- Ferreira, T. B., Alves, P. M., Aunins, J. G., et Carrondo, M. J. (2005). Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines. *Gene Ther* **12 Suppl 1**, S73-83.
- Finsterbusch, T., et Mankertz, A. (2009). Porcine circoviruses--small but powerful. *Virus Res* **143**(2), 177-183.
- Flores-Mendoza, L., Silva-Campa, E., Resendiz, M., Osorio, F. A., et Hernandez, J. (2008). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clin Vaccine Immunol* **15**(4), 720-725.
- Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segales, J., et Mateu, E. (2007). Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet Microbiol* **125**(3-4), 244-255.
- Fort, M., Sibila, M., Nofrarias, M., Perez-Martin, E., Olvera, A., Mateu, E., et Segales, J. (2010). Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins are involved in the development of cell-mediated immunity upon PCV2 infection. *Vet Immunol Immunopathol* **137**(3-4), 226-234.
- Foss, D. L., Zilliox, M. J., Meier, W., Zuckermann, F., et Murtaugh, M. P. (2002). Adjuvant danger signals increase the immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol* **15**(4), 557-566.



- Franchi, L., Warner, N., Viani, K., et Nunez, G. (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* **227**(1), 106-128.
- Fujimura, Y. (2000). Evidence of M cells as portals of entry for antigens in the nasopharyngeal lymphoid tissue of humans. *Virchows Arch* **436**(6), 560-566.
- Funderburg, N., Lederman, M. M., Feng, Z., Drage, M. G., Jadowsky, J., Harding, C. V., Weinberg, A., et Sieg, S. F. (2007). Human  $\alpha$ -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(47), 18631-18635.
- Gagnon, C. A., del Castillo, J. R., Music, N., Fontaine, G., Harel, J., et Tremblay, D. (2008). Development and use of a multiplex real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of Porcine circovirus-2 genotypes 2a and 2b in an epidemiological survey. *J Vet Diagn Invest* **20**(5), 545-558.
- Gagnon, C. A., Lachapelle, G., Langelier, Y., Massie, B., et Dea, S. (2003). Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. *Arch Virol* **148**(5), 951-972.
- Gagnon, C. A., Music, N., Fontaine, G., Tremblay, D., et Harel, J. (2010). Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): a type 1 and type 2 PCV recombinant. *Vet Microbiol* **144**(1-2), 18-23.
- Gagnon, C. A., Tremblay, D., Tijssen, P., Venne, M. H., Houde, A., et Elahi, S. M. (2007). The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J* **48**(8), 811-819.
- Galina, L., Pijoan, C., Sitjar, M., Christianson, W. T., Rossow, K., et Collins, J. E. (1994). Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Vet Rec* **134**(3), 60-64.
- Genini, S., Delputte, P. L., Malinverni, R., Cecere, M., Stella, A., Nauwynck, H. J., et Giuffra, E. (2008). Genome-wide transcriptional response of primary alveolar macrophages following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* **89**(Pt 10), 2550-2564.
- Genzow, M., Schwartz, K., Gonzalez, G., Anderson, G., et Chittick, W. (2009). The effect of vaccination against Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on the Porcine circovirus-2 (PCV-2) load in porcine circovirus associated disease (PCVAD) affected pigs. *Can J Vet Res* **73**(2), 87-90.
- Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X. J., Pelzer, K., et Buechner-Maxwell, V. (2009). Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J Vet Intern Med* **23**(6), 1151-1163.
- Gimeno, M., Darwich, L., Diaz, I., de la Torre, E., Pujols, J., Martin, M., Inumaru, S., Cano, E., Domingo, M., Montoya, M., et Mateu, E. (2011). Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-I porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet Res* **42**(1), 9.

- Goldberg, T. L., Hahn, E. C., Weigel, R. M., et Scherba, G. (2000). Genetic, geographical and temporal variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Illinois. *J Gen Virol* **81**(Pt 1), 171-179.
- Goldberg, T. L., Lowe, J. F., Milburn, S. M., et Firkins, L. D. (2003). Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection. *Virology* **317**(2), 197-207.
- Gomez Corredor, A., et Archambault, D. (2009). The bovine immunodeficiency virus rev protein: identification of a novel lentiviral bipartite nuclear localization signal harboring an atypical spacer sequence. *J Virol* **83**(24), 12842-12853.
- Gomez Corredor, A., et Archambault, D. (2012). The bovine immunodeficiency virus Rev protein: identification of a novel nuclear import pathway and nuclear export signal among retroviral Rev/Rev-like proteins. *J Virol* **86**(9), 4892-4905.
- Gonin, P., Mardassi, H., Gagnon, C. A., Massie, B., et Dea, S. (1998). A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* **143**(10), 1927-1940.
- Gonin, P., Pirzadeh, B., Gagnon, C. A., et Dea, S. (1999). Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J Vet Diagn Invest* **11**(1), 20-26.
- Goodwin, R. F., Pomeroy, A. P., et Whittlestone, P. (1965). Production of Enzootic Pneumonia with a Mycoplasma. *Vet Rec.* **77**, 1247-1249.
- Gregoriadis, G. (1998). Genetic vaccines: strategies for optimization. *Pharm Res* **15**(5), 661-670.
- Ha, Y., Ahn, K. K., Kim, B., Cho, K. D., Lee, B. H., Oh, Y. S., Kim, S. H., et Chae, C. (2009). Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in milk from experimentally infected sows. *Res Vet Sci* **86**(1), 108-110.
- Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., et Decostere, A. (2004). Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet Microbiol* **100**(3-4), 255-268.
- Halstead, S. B., Mahalingam, S., Marovich, M. A., Ubol, S., et Mosser, D. M. (2010). Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *Lancet Infect Dis* **10**(10), 712-722.
- Hamel, A. L., Lin, L. L., et Nayar, G. P. (1998). Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* **72**(6), 5262-5267.
- Han, J., Rutherford, M. S., et Faaberg, K. S. (2010). Proteolytic Products of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nsp2 Replicase Protein. *J Virol* **84**, 10102-10112.

- Han, Y. W., Kim, S. B., Rahman, M., Uyangaa, E., Lee, B. M., Kim, J. H., Park, K. I., Hong, J. T., Han, S. B., et Eo, S. K. (2011). Systemic and mucosal immunity induced by attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing ORF7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **34**(4), 335-345.
- Hansen, M. S., Pors, S. E., Jensen, H. E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E. M., et Nielsen, O. L. (2010). An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J Comp Pathol* **143**(2-3), 120-131.
- Harakuni, T., Sugawa, H., Komesu, A., Tadano, M., et Arakawa, T. (2005). Heteropentameric cholera toxin B subunit chimeric molecules genetically fused to a vaccine antigen induce systemic and mucosal immune responses: a potential new strategy to target recombinant vaccine antigens to mucosal immune systems. *Infect Immun* **73**(9), 5654-5665.
- Harding, J. C. (2004). The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol* **98**(2), 131-135.
- Hasslung, F., Wallgren, P., Ladekjaer-Hansen, A. S., Botner, A., Nielsen, J., Watrang, E., Allan, G. M., McNeilly, F., Ellis, J., Timmusk, S., Belak, K., Segall, T., Melin, L., Berg, M., et Fossum, C. (2005). Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* **106**(1-2), 49-60.
- He, Y., Barker, S. J., MacDonald, A. J., Yu, Y., Cao, L., Li, J., Parhar, R., Heck, S., Hartmann, S., Golenbock, D. T., Jiang, S., Libri, N. A., Semper, A. E., Rosenberg, W. M., et Lustigman, S. (2009). Recombinant Ov-ASP-1, a Th1-biased protein adjuvant derived from the helminth *Onchocerca volvulus*, can directly bind and activate antigen-presenting cells. *J Immunol* **182**(7), 4005-4016.
- Heath, W. R., et Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* **1**(2), 126-134.
- Hesse, R., Kerrigan, M., et Rowland, R. R. (2008). Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Res* **132**(1-2), 201-207.
- Holtkamp, D., Kliebenstein, J., Zimmerman, J., Neumann, E., Rotto, H., Yoder, T., Wang, C., Yeske, P., Mowrer, C., et Haley, C. (2012). Economic Impact of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus on U.S. Pork Producers. Iowa, USA: Animal Industry report (AS 658, ASL R2671).
- Horlen, K. P., Dritz, S. S., Nietfeld, J. C., Henry, S. C., Hesse, R. A., Oberst, R., Hays, M., Anderson, J., et Rowland, R. R. (2008). A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2. *J Am Vet Med Assoc* **232**(6), 906-912.



- Hou, Y. H., Chen, J., Tong, G. Z., Tian, Z. J., Zhou, Y. J., Li, G. X., Li, X., Peng, J. M., An, T. Q., et Yang, H. C. (2008). A recombinant plasmid co-expressing swine ubiquitin and the GP5 encoding-gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces protective immunity in piglets. *Vaccine* **26**(11), 1438-1449.
- Hsu, T., Artiushin, S., et Minion, F. C. (1997). Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Bacteriol* **179**(4), 1317-1323.
- Hsu, T., et Minion, F. C. (1998a). Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect Immun* **66**(10), 4762-4766.
- Hsu, T., et Minion, F. C. (1998b). Molecular analysis of the P97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Gene* **214**(1-2), 13-23.
- Huang, L. P., Lu, Y. H., Wei, Y. W., Guo, L. J., et Liu, C. M. (2011). Identification of one critical amino acid that determines a conformational neutralizing epitope in the capsid protein of porcine circovirus type 2. *BMC Microbiol* **11**, 188.
- Hwang, M. H., Damte, D., Lee, J. S., Gebru, E., Chang, Z. Q., Cheng, H., Jung, B. Y., Rhee, M. H., et Park, S. C. (2011). *Mycoplasma hyopneumoniae* induces pro-inflammatory cytokine and nitric oxide production through NFkappaB and MAPK pathways in RAW264.7 cells. *Vet Res Commun* **35**(1), 21-34.
- Imler, J. L., Chartier, C., Dreyer, D., Dieterle, A., Sainte-Marie, M., Faure, T., Pavirani, A., et Mehtali, M. (1996). Novel complementation cell lines derived from human lung carcinoma A549 cells support the growth of E1-deleted adenovirus vectors. *Gene Ther* **3**(1), 75-84.
- Iwasaki, A., et Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**(10), 987-995.
- Jacques, M., Blanchard, B., Foiry, B., Girard, C., et Kobisch, M. (1992). In vitro colonization of porcine trachea by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Ann Rech Vet* **23**(3), 239-247.
- Jenkins, C., Wilton, J. L., Minion, F. C., Falconer, L., Walker, M. J., et Djordjevic, S. P. (2006). Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin. *Infect Immun* **74**(1), 481-487.
- Jeong, H. J., Song, Y. J., Lee, S. W., Lee, J. B., Park, S. Y., Song, C. S., Ha, G. W., Oh, J. S., Oh, Y. K., et Choi, I. S. (2010). Comparative measurement of cell-mediated immune responses of swine to the M and N proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Vaccine Immunol* **17**(4), 503-512.
- Jiang, P., Jiang, W., Li, Y., Wu, S., et Xu, J. (2004). Humoral immune response induced by oral administration of *S. typhimurium* containing a DNA vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* **102**(3), 321-328.



- Jiang, W., Jiang, P., Li, Y., Tang, J., Wang, X., et Ma, S. (2006a). Recombinant adenovirus expressing GP5 and M fusion proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induce both humoral and cell-mediated immune responses in mice. *Vet Immunol Immunopathol* **113**(1-2), 169-180.
- Jiang, W., Jiang, P., Li, Y., Wang, X., et Du, Y. (2007a). Analysis of immunogenicity of minor envelope protein GP3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mice. *Virus Genes* **35**(3), 695-704.
- Jiang, W., Jiang, P., Wang, X., Li, Y., et Du, Y. (2008). Enhanced immune responses of mice inoculated recombinant adenoviruses expressing GP5 by fusion with GP3 and/or GP4 of PRRS virus. *Virus Res* **136**(1-2), 50-57.
- Jiang, W., Jiang, P., Wang, X., Li, Y., Wang, X., et Du, Y. (2007b). Influence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 glycoprotein N-linked glycans on immune responses in mice. *Virus Genes* **35**(3), 663-671.
- Jiang, Y., Fang, L., Xiao, S., Li, B., Pan, Y., Luo, R., et Chen, H. (2009). A suicidal DNA vaccine co-expressing two major membrane-associated proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigens induce protective responses. *Biotechnol Lett* **31**(4), 509-518.
- Jiang, Y., Fang, L., Xiao, S., Zhang, H., Pan, Y., Luo, R., Li, B., et Chen, H. (2007c). Immunogenicity and protective efficacy of recombinant pseudorabies virus expressing the two major membrane-associated proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* **25**(3), 547-560.
- Jiang, Y., Xiao, S., Fang, L., Yu, X., Song, Y., Niu, C., et Chen, H. (2006b). DNA vaccines co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) display enhanced immunogenicity. *Vaccine* **24**(15), 2869-2879.
- Johnson, C. R., Griggs, T. F., Gnanandarajah, J., et Murtaugh, M. P. (2011). Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses. *J Gen Virol* **92**(Pt 5), 1107-1116.
- Johnson, C. R., Yu, W., et Murtaugh, M. P. (2007). Cross-reactive antibody responses to nsp1 and nsp2 of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* **88**(Pt 4), 1184-1195.
- Ju, C., Fan, H., Tan, Y., Liu, Z., Xi, X., Cao, S., Wu, B., et Chen, H. (2005). Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* **109**(3-4), 179-190.
- Kamstrup, S., Barfoed, A. M., Frimann, T. H., Ladekjaer-Mikkelsen, A. S., et Botner, A. (2004). Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine* **22**(11-12), 1358-1361.
- Karber, G. (1931). 50% end-point calculation. *Archives of Experimental Pathology and Pharmacology*(162), 480-483.
- Karuppannan, A. K., Jong, M. H., Lee, S. H., Zhu, Y., Selvaraj, M., Lau, J., Jia, Q., et Kwang, J. (2009). Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. *Virology* **383**(2), 338-347.

- Kawai, T., et Akira, S. (2007). TLR signaling. *Semin Immunol* **19**(1), 24-32.
- Keffaber, K. K. (1989). Reproductive failure of unknown etiology. *Am Assoc Swine Pract Newsl* **1**(2), 1-9.
- Kekarainen, T., McCullough, K., Fort, M., Fossum, C., Segales, J., et Allan, G. M. (2010). Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. *Vet Immunol Immunopathol* **136**(3-4), 185-193.
- Kekarainen, T., Montoya, M., Mateu, E., et Segales, J. (2008). Porcine circovirus type 2-induced interleukin-10 modulates recall antigen responses. *J Gen Virol* **89**(Pt 3), 760-765.
- Kheyar, A., Jabrane, A., Zhu, C., Cleroux, P., Massie, B., Dea, S., et Gagnon, C. A. (2005). Alternative codon usage of PRRS virus ORF5 gene increases eucaryotic expression of GP(5) glycoprotein and improves immune response in challenged pigs. *Vaccine* **23**(31), 4016-4022.
- Kim, D., Kim, C. H., Han, K., Seo, H. W., Oh, Y., Park, C., Kang, I., et Chae, C. (2011a). Comparative efficacy of commercial Mycoplasma hyopneumoniae and porcine circovirus 2 (PCV2) vaccines in pigs experimentally infected with M. hyopneumoniae and PCV2. *Vaccine* **29**(17), 3206-3212.
- Kim, H., Kim, H. K., Jung, J. H., Choi, Y. J., Kim, J., Um, C. G., Hyun, S. B., Shin, S., Lee, B., Jang, G., Kang, B. K., Moon, H. J., et Song, D. S. (2011b). The assessment of efficacy of porcine reproductive respiratory syndrome virus inactivated vaccine based on the viral quantity and inactivation methods. *Virol J* **8**, 323.
- Kim, J., Chung, H. K., et Chae, C. (2003). Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J* **166**(3), 251-256.
- Kim, O., Sun, Y., Lai, F. W., Song, C., et Yoo, D. (2010). Modulation of type I interferon induction by porcine reproductive and respiratory syndrome virus and degradation of CREB-binding protein by non-structural protein 1 in MARC-145 and HeLa cells. *Virology* **402**(2), 315-326.
- Kim, T. G., et Langridge, W. H. (2003). Assembly of cholera toxin B subunit full-length rotavirus NSP4 fusion protein oligomers in transgenic potato. *Plant Cell Rep* **21**(9), 884-890.
- King, K. W., Faulds, D. H., Rosey, E. L., et Yancey, R. J., Jr. (1997). Characterization of the gene encoding Mhp1 from Mycoplasma hyopneumoniae and examination of Mhp1's vaccine potential. *Vaccine* **15**(1), 25-35.
- Kixmoller, M., Ritzmann, M., Eddicks, M., Saalmuller, A., Elbers, K., et Fachinger, V. (2008). Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* **26**(27-28), 3443-3451.
- Kobisch, M., Blanchard, B., et Le Potier, M. F. (1993). Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. *Vet Res* **24**(1), 67-77.
- Kobisch, M., et Friis, N. F. (1996). Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech* **15**(4), 1569-1605.

- Kobisch, M., et Marois, C. (2008). Les mycoplasmoses porcines. *Bulletin de l'académie vétérinaire de France* **161**, 179-184.
- Kobisch, M., et Tillon, J. P. (1976). Pneumonie enzootique du porc: isolement d'une souche de *Mycoplasma suis pneumoniae* et reproduction de la maladie. *Rec Méd Vét* **152**, 817-827.
- Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Waldner, C., Rings, D. M., et Allan, G. (2007). Mycoplasma hyopneumoniae bacterins and porcine circovirus type 2 (PCV2) infection: induction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the gnotobiotic swine model of PCV2-associated disease. *Can Vet J* **48**(7), 716-724.
- Krakowka, S., Ellis, J. A., McNeilly, F., Ringler, S., Rings, D. M., et Allan, G. (2001). Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol* **38**(1), 31-42.
- Kroese, M. V., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Bos-de Ruijter, J. N., Peeters, B. P., Meulenberg, J. J., Cornelissen, L. A., et Snijder, E. J. (2008). The nsplalpha and nspl papain-like autoproteases are essential for porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA synthesis. *J Gen Virol* **89**(Pt 2), 494-499.
- Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J., et Finberg, R. W. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* **1**(5), 398-401.
- Kwon, B., Ansari, I. H., Pattnaik, A. K., et Osorio, F. A. (2008). Identification of virulence determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through construction of chimeric clones. *Virology* **380**(2), 371-378.
- Labarque, G., Van Gucht, S., Nauwynck, H., Van Reeth, K., et Pensaert, M. (2003). Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines. *Vet Res* **34**(3), 249-260.
- Labarque, G. G., Nauwynck, H. J., Van Reeth, K., et Pensaert, M. B. (2000). Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. *J Gen Virol* **81**(Pt 5), 1327-1334.
- Lager, K. M., et Halbur, P. G. (1996). Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest* **8**(3), 275-282.
- Larochelle, R., Magar, R., et D'Allaire, S. (2003). Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* **67**(2), 114-120.
- Lavelle, E. C. (2005). Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. *Cell Mol Life Sci* **62**(23), 2750-2770.



- Lawson, S. R., Rossow, K. D., Collins, J. E., Benfield, D. A., et Rowland, R. R. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of gnotobiotic pigs: sites of virus replication and co-localization with MAC-387 staining at 21 days post-infection. *Virus Res* **51**(2), 105-113.
- LeCann, P., Albina, E., Madec, F., Cariolet, R., et Jestin, A. (1997). Piglet wasting disease. *Vet Rec* **141**(25), 660.
- Lee, C., Bachand, A., Murtaugh, M. P., et Yoo, D. (2004). Differential host cell gene expression regulated by the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP4 and GP5 glycoproteins. *Vet Immunol Immunopathol* **102**(3), 189-198.
- Lee, C., et Yoo, D. (2006). The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. *Virology* **355**(1), 30-43.
- Lee, M. S., et Kim, Y. J. (2007). Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem* **76**, 447-480.
- Lefebvre, D. J., Benaissa-Trouw, B., Vliegenthart, J. F., Kamerling, J. P., Jansen, W. T., Kraaijeveld, K., et Snippe, H. (2003). Th1-directing adjuvants increase the immunogenicity of oligosaccharide-protein conjugate vaccines related to *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Infect Immun* **71**(12), 6915-6920.
- Lefebvre, D. J., Costers, S., Van Doorselaere, J., Misinzo, G., Delputte, P. L., et Nauwynck, H. J. (2008). Antigenic differences among porcine circovirus type 2 strains, as demonstrated by the use of monoclonal antibodies. *J Gen Virol* **89**(Pt 1), 177-187.
- Lefebvre, D. J., Van Doorselaere, J., Delputte, P. L., et Nauwynck, H. J. (2009). Recombination of two porcine circovirus type 2 strains. *Arch Virol* **154**(5), 875-879.
- Lekcharoensuk, P., Morozov, I., Paul, P. S., Thangthumnyom, N., Wajjawalku, W., et Meng, X. J. (2004). Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J Virol* **78**(15), 8135-8145.
- Leroux-Roels, G. (2010). Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine* **28 Suppl 3**, C25-36.
- Li, B., Xiao, S., Wang, Y., Xu, S., Jiang, Y., Chen, H., et Fang, L. (2009a). Immunogenicity of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 protein encoded by a synthetic ORF5 gene. *Vaccine* **27**(13), 1957-1963.
- Li, J., Jiang, P., Li, Y., Wang, X., Cao, J., Wang, X., et Zeshan, B. (2009b). HSP70 fused with GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus enhanced the immune responses and protective efficacy against virulent PRRSV challenge in pigs. *Vaccine* **27**(6), 825-832.
- Liebler-Tenorio, E. M., et Pabst, R. (2006). MALT structure and function in farm animals. *Vet Res* **37**(3), 257-280.



- Lightfield, K. L., Persson, J., Brubaker, S. W., Witte, C. E., von Moltke, J., Dunipace, E. A., Henry, T., Sun, Y. H., Cado, D., Dietrich, W. F., Monack, D. M., Tsolis, R. M., et Vance, R. E. (2008). Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol* **9**(10), 1171-1178.
- Linghua, Z., Xingshan, T., et Fengzhen, Z. (2007). Vaccination with porcine reproductive and respiratory syndrome killed virus vaccine and immunostimulatory oligodeoxynucleotides induces specific immunity in piglets. *Vaccine* **25**(10), 1735-1742.
- Liu, C. H., Chaung, H. C., Chang, H. L., Peng, Y. T., et Chung, W. B. (2009). Expression of Toll-like receptor mRNA and cytokines in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* **136**(3-4), 266-276.
- Liu, J., Chen, I., et Kwang, J. (2005). Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol* **79**(13), 8262-8274.
- Liu, L. J., Suzuki, T., Tsunemitsu, H., Kataoka, M., Ngata, N., Takeda, N., Wakita, T., Miyamura, T., et Li, T. C. (2008). Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus. *Arch Virol* **153**(12), 2291-2295.
- Liu, M. A. (2010). Immunologic basis of vaccine vectors. *Immunity* **33**(4), 504-515.
- Loemba, H. D., Mounir, S., Mardassi, H., Archambault, D., et Dea, S. (1996). Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* **141**(3-4), 751-761.
- Lopez-Soria, S., Segales, J., Rose, N., Vinas, M. J., Blanchard, P., Madec, F., Jestin, A., Casal, J., et Domingo, M. (2005). An exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Prev Vet Med* **69**(1-2), 97-107.
- Lopez Fuertes, L., Domenech, N., Alvarez, B., Ezquerro, A., Dominguez, J., Castro, J. M., et Alonso, F. (1999). Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res* **64**(1), 33-42.
- Lopez, O. J., Oliveira, M. F., Garcia, E. A., Kwon, B. J., Doster, A., et Osorio, F. A. (2007). Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent. *Clin Vaccine Immunol* **14**(3), 269-275.
- Lopez, O. J., et Osorio, F. A. (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet Immunol Immunopathol* **102**(3), 155-163.
- Loving, C. L., Brockmeier, S. L., et Sacco, R. E. (2007). Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology* **120**(2), 217-229.

- Lowe, J. E., Husmann, R., Firkins, L. D., Zuckermann, F. A., et Goldberg, T. L. (2005). Correlation of cell-mediated immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus with protection against reproductive failure in sows during outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome in commercial herds. *J Am Vet Med Assoc* **226**(10), 1707-1711.
- Madsen, K. G., Hansen, C. M., Madsen, E. S., Strandbygaard, B., Botner, A., et Sorensen, K. J. (1998). Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds. *Arch Virol* **143**(9), 1683-1700.
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., et Haesebrouck, F. (2008). Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol* **126**(4), 297-309.
- Magar, R., Larochelle, R., Thibault, S., et Lamontagne, L. (2000). Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. *J Comp Pathol* **123**(4), 258-269.
- Mahe, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnauld, C., Le Cann, P., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E., et Jestin, A. (2000). Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol* **81**(Pt 7), 1815-1824.
- Malley, R., Henneke, P., Morse, S. C., Cieslewicz, M. J., Lipsitch, M., Thompson, C. M., Kurt-Jones, E., Paton, J. C., Wessels, M. R., et Golenbock, D. T. (2003). Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4), 1966-1971.
- Mankertz, A., Mueller, B., Steinfeldt, T., Schmitt, C., et Finsterbusch, T. (2003). New reporter gene-based replication assay reveals exchangeability of replication factors of porcine circovirus types 1 and 2. *J Virol* **77**(18), 9885-9893.
- Mardassi, H., Gonin, P., Gagnon, C. A., Massie, B., et Dea, S. (1998). A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form. *J Virol* **72**(8), 6298-6306.
- Mardassi, H., Massie, B., et Dea, S. (1996). Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* **221**(1), 98-112.
- Mardassi, H., Mounir, S., et Dea, S. (1995). Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain. *Arch Virol* **140**(8), 1405-1418.
- Mare, C. J., et Switzer, W. P. (1965). New Species: *Mycoplasma Hyopneumoniae*; a Causative Agent of Virus Pig Pneumonia. *Vet Med Small Anim Clin* **60**, 841-846.
- Marois, C., Le Carrou, J., Kobisch, M., et Gautier-Bouchardon, A. V. (2007). Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Vet Microbiol* **120**(1-2), 96-104.

- Martelli, P., Cordioli, P., Alborali, L. G., Gozio, S., De Angelis, E., Ferrari, L., Lombardi, G., et Borghetti, P. (2007). Protection and immune response in pigs intradermally vaccinated against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and subsequently exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain. *Vaccine* **25**(17), 3400-3408.
- Martelli, P., Gozio, S., Ferrari, L., Rosina, S., De Angelis, E., Quintavalla, C., Bottarelli, E., et Borghetti, P. (2009). Efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain: Clinical protection and cell-mediated immunity. *Vaccine* **27**(28), 3788-3799.
- Martinez-Lobo, F. J., Diez-Fuertes, F., Simarro, I., Castro, J. M., et Prieto, C. (2011). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus isolates differ in their susceptibility to neutralization. *Vaccine* **29**(40), 6928-6940.
- Mateu, E., et Diaz, I. (2008). The challenge of PRRS immunology. *Vet J* **177**(3), 345-351.
- Matoba, N., Magerus, A., Geyer, B. C., Zhang, Y., Muralidharan, M., Alfsen, A., Arntzen, C. J., Bomsel, M., et Mor, T. S. (2004). A mucosally targeted subunit vaccine candidate eliciting HIV-1 transcytosis-blocking Abs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(37), 13584-13589.
- McKeown, N. E., Opriessnig, T., Thomas, P., Guenette, D. K., Elvinger, F., Fenaux, M., Halbur, P. G., et Meng, X. J. (2005). Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**(11), 1347-1351.
- Meehan, B. M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V. A., Ellis, J. A., Hassard, L. E., Clark, E. G., Haines, D. M., et Allan, G. M. (1998). Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* **79** ( Pt 9), 2171-2179.
- Meerts, P., Misinzo, G., Lefebvre, D., Nielsen, J., Botner, A., Kristensen, C. S., et Nauwynck, H. J. (2006). Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Vet Res* **2**, 6.
- Meerts, P., Van Gucht, S., Cox, E., Vandebosch, A., et Nauwynck, H. J. (2005). Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol* **18**(2), 333-341.
- Meier, W. A., Galeota, J., Osorio, F. A., Husmann, R. J., Schnitzlein, W. M., et Zuckermann, F. A. (2003). Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* **309**(1), 18-31.
- Meng, X. J., Paul, P. S., Halbur, P. G., et Lum, M. A. (1995). Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Arch Virol* **140**(4), 745-755.

- Mestecky, J. (1987). The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol* **7**(4), 265-276.
- Meulenberg, J. J. (2000). PRRSV, the virus. *Vet Res* **31**(1), 11-21.
- Meulenberg, J. J., van Nieuwstadt, A. P., van Essen-Zandbergen, A., et Langeveld, J. P. (1997). Posttranslational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus. *J Virol* **71**(8), 6061-6067.
- Meyns, T., Dewulf, J., de Kruif, A., Calus, D., Haesebrouck, F., et Maes, D. (2006). Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine* **24**(49-50), 7081-7086.
- Miao, E. A., Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I., et Aderem, A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 beta via Ipaf. *Nat Immunol* **7**(6), 569-575.
- Miguel, J. C., Chen, J., Van Alstine, W. G., et Johnson, R. W. (2010). Expression of inflammatory cytokines and Toll-like receptors in the brain and respiratory tract of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* **135**(3-4), 314-319.
- Minion, F. C. (2002). Molecular pathogenesis of mycoplasma animal respiratory pathogens. *Front Biosci* **7**, d1410-1422.
- Minion, F. C., Adams, C., et Hsu, T. (2000). R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect Immun* **68**(5), 3056-3060.
- Minion, F. C., Lefkowitz, E. J., Madsen, M. L., Cleary, B. J., Swartzell, S. M., et Mahairas, G. G. (2004). The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J Bacteriol* **186**(21), 7123-7133.
- Misinzo, G., Delputte, P. L., Meerts, P., Drexler, C., et Nauwynck, H. J. (2006). Efficacy of an inactivated PRRSV vaccine: induction of virus-neutralizing antibodies and partial virological protection upon challenge. *Adv Exp Med Biol* **581**, 449-454.
- Mizel, S. B., et Bates, J. T. (2010). Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J Immunol* **185**(10), 5677-5682.
- Morris, C. R., Gardner, I. A., Hietala, S. K., et Carpenter, T. E. (1995). Enzootic pneumonia: comparison of cough and lung lesions as predictors of weight gain in swine. *Can J Vet Res* **59**(3), 197-204.
- Mosmann, T. R., et Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**, 145-173.
- Mullick, A., Xu, Y., Warren, R., Koutroumanis, M., Guilbault, C., Broussau, S., Malenfant, F., Bourget, L., Lamoureux, L., Lo, R., Caron, A. W., Pilote, A., et Massie, B. (2006). The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol* **6**, 43.



- Muneta, Y., Minagawa, Y., Shimoji, Y., Nagata, R., Markham, P. F., Browning, G. F., et Mori, Y. (2006). IL-18 expression in pigs following infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Interferon Cytokine Res* **26**(9), 637-644.
- Muneta, Y., Uenishi, H., Kikuma, R., Yoshihara, K., Shimoji, Y., Yamamoto, R., Hamashima, N., Yokomizo, Y., et Mori, Y. (2003). Porcine TLR2 and TLR6: identification and their involvement in *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *J Interferon Cytokine Res* **23**(10), 583-590.
- Murtaugh, M. P., Elam, M. R., et Kakach, L. T. (1995). Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch Virol* **140**(8), 1451-1460.
- Murtaugh, M. P., Faaberg, K. S., Laber, J., Elam, M., et Kapur, V. (1998). Genetic variation in the PRRS virus. *Adv Exp Med Biol* **440**, 787-794.
- Murtaugh, M. P., et Genzow, M. (2011). Immunological solutions for treatment and prevention of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Vaccine* **29**(46), 8192-8204.
- Murtaugh, M. P., Stadejek, T., Abrahante, J. E., Lam, T. T., et Leung, F. C. (2010). The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* **154**(1-2), 18-30.
- Music, N., et Gagnon, C. A. (2010). The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Anim Health Res Rev* **11**(2), 135-163.
- Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S. R., Harms, P. A., Sorden, S. D., et Paul, P. S. (2000). Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* **81**(Pt 9), 2281-2287.
- Nayar, G. P., Hamel, A., et Lin, L. (1997). Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can Vet J* **38**(6), 385-386.
- Nedialkova, D. D., Ulferts, R., van den Born, E., Lauber, C., Gorbalenya, A. E., Ziebuhr, J., et Snijder, E. J. (2009). Biochemical characterization of arterivirus nonstructural protein 11 reveals the nidovirus-wide conservation of a replicative endoribonuclease. *J Virol* **83**(11), 5671-5682.
- Nelsen, C. J., Murtaugh, M. P., et Faaberg, K. S. (1999). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol* **73**(1), 270-280.
- Nelson, E. A., Christopher-Hennings, J., et Benfield, D. A. (1994). Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Diagn Invest* **6**(4), 410-415.
- Neumann, K., J., M., B., S., G., et Z. (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* **227**(3), 385-392.

- Nielsen, J., Vincent, I. E., Botner, A., Ladekaer-Mikkelsen, A. S., Allan, G., Summerfield, A., et McCullough, K. C. (2003). Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* **92**(3-4), 97-111.
- Nielsen, T. L., Nielsen, J., Have, P., Baekbo, P., Hoff-Jorgensen, R., et Botner, A. (1997). Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* **54**(2), 101-112.
- Noyes, E. P., Feeney, D. A., et Pijoan, C. (1990). Comparison of the effect of pneumonia detected during lifetime with pneumonia detected at slaughter on growth in swine. *J Am Vet Med Assoc* **197**(8), 1025-1029.
- Ogawa, Y., Oishi, E., Muneta, Y., Sano, A., Hikono, H., Shibahara, T., Yagi, Y., et Shimoji, Y. (2009). Oral vaccination against mycoplasmal pneumonia of swine using a live *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strain as a vector. *Vaccine* **27**(33), 4543-4550.
- Ogra, P. L., Faden, H., et Welliver, R. C. (2001). Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clin Microbiol Rev* **14**(2), 430-445.
- Okamba, F. R., Arella, M., Music, N., Jia, J. J., Gottschalk, M., et Gagnon, C. A. (2010). Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. *Vaccine* **28**(30), 4802-4809.
- Okamba, F. R., Moreau, E., Cheikh Saad Bouh, K., Gagnon, C. A., Massie, B., et Arella, M. (2007). Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Clin Vaccine Immunol* **14**(6), 767-774.
- Olvera, A., Cortey, M., et Segales, J. (2007). Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* **357**(2), 175-185.
- Opriessnig, T., Fenaux, M., Thomas, P., Hoogland, M. J., Rothschild, M. F., Meng, X. J., et Halbur, P. G. (2006a). Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. *Vet Pathol* **43**(3), 281-293.
- Opriessnig, T., Halbur, P. G., Yu, S., Thacker, E. L., Fenaux, M., et Meng, X. J. (2006b). Effects of the timing of the administration of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. *Vet Rec* **158**(5), 149-154.
- Opriessnig, T., McKeown, N. E., Harmon, K. L., Meng, X. J., et Halbur, P. G. (2006c). Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. *Clin Vaccine Immunol* **13**(8), 923-929.



- Opriessnig, T., Meng, X. J., et Halbur, P. G. (2007). Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* **19**(6), 591-615.
- Opriessnig, T., Patterson, A. R., Madson, D. M., Pal, N., Rothschild, M., Kuhar, D., Lunney, J. K., Juhan, N. M., Meng, X. J., et Halbur, P. G. (2009). Difference in severity of porcine circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. *J Anim Sci* **87**(5), 1582-1590.
- Opriessnig, T., Ramamoorthy, S., Madson, D. M., Patterson, A. R., Pal, N., Carman, S., Meng, X. J., et Halbur, P. G. (2008). Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *J Gen Virol* **89**(Pt 10), 2482-2491.
- Opriessnig, T., Thacker, E. L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X. J., et Halbur, P. G. (2004). Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* **41**(6), 624-640.
- Opriessnig, T., Yu, S., Gallup, J. M., Evans, R. B., Fenaux, M., Pallares, F., Thacker, E. L., Brockus, C. W., Ackermann, M. R., Thomas, P., Meng, X. J., et Halbur, P. G. (2003). Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pathol* **40**(5), 521-529.
- Osorio, F. A., Galeota, J. A., Nelson, E., Brodersen, B., Doster, A., Wills, R., Zuckermann, F., et Laegreid, W. W. (2002). Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. *Virology* **302**(1), 9-20.
- Ostanello, F., Caprioli, A., Di Francesco, A., Battilani, M., Sala, G., Sarli, G., Mandrioli, L., McNeilly, F., Allan, G. M., et Prosperi, S. (2005). Experimental infection of 3-week-old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet Microbiol* **108**(3-4), 179-186.
- Ostrowski, M., Galeota, J. A., Jar, A. M., Platt, K. B., Osorio, F. A., et Lopez, O. J. (2002). Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J Virol* **76**(9), 4241-4250.
- Otake, S., Dee, S., Corzo, C., Oliveira, S., et Deen, J. (2010). Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet Microbiol* **145**(3-4), 198-208.
- Oualikene, W., Lamoureux, L., Weber, J. M., et Massie, B. (2000). Protease-deleted adenovirus vectors and complementing cell lines: potential applications of single-round replication mutants for vaccination and gene therapy. *Hum Gene Ther* **11**(9), 1341-1353.

- Overend, C., Mitchell, R., He, D., Rompato, G., Grubman, M. J., et Garmendia, A. E. (2007). Recombinant swine beta interferon protects swine alveolar macrophages and MARC-145 cells from infection with Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* **88**(Pt 3), 925-931.
- Papatsiros, V. G., Alexopoulos, C., Kritas, S. K., Koptopoulos, G., Nauwynck, H. J., Pensaert, M. B., et Kyriakis, S. C. (2006). Long-term administration of a commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-inactivated vaccine in PRRSV-endemically infected sows. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **53**(6), 266-272.
- Parida, R., Choi, I. S., Peterson, D. A., Pattnaik, A. K., Laegreid, W., Zuckermann, F. A., et Osorio, F. A. (2012). Location of T-cell epitopes in nonstructural proteins 9 and 10 of type-II porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* **169**(1), 13-21.
- Park, J. S., Kim, J., Ha, Y., Jung, K., Choi, C., Lim, J. K., Kim, S. H., et Chae, C. (2005). Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J Comp Pathol* **132**(2-3), 139-144.
- Park, S. C., Yibchok-Anun, S., Cheng, H., Young, T. F., Thacker, E. L., Minion, F. C., Ross, R. F., et Hsu, W. H. (2002). Mycoplasma hyopneumoniae increases intracellular calcium release in porcine ciliated tracheal cells. *Infect Immun* **70**(5), 2502-2506.
- Pasternak, A. O., Spaan, W. J., et Snijder, E. J. (2006). Nidovirus transcription: how to make sense...? *J Gen Virol* **87**(Pt 6), 1403-1421.
- Patel, D., Nan, Y., Shen, M., Ritthipichai, K., Zhu, X., et Zhang, Y. J. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits type I interferon signaling by blocking STAT1/STAT2 nuclear translocation. *J Virol* **84**(21), 11045-11055.
- Patterson, A. R., Ramamoorthy, S., Madson, D. M., Meng, X. J., Halbur, P. G., et Opriessnig, T. (2011). Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after experimental infection. *Vet Microbiol* **149**(1-2), 91-98.
- Patton, J. B., Rowland, R. R., Yoo, D., et Chang, K. O. (2009). Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages. *Virus Res* **140**(1-2), 161-171.
- Pei, Y., Hodgins, D. C., Lee, C., Calvert, J. G., Welch, S. K., Jolie, R., Keith, M., et Yoo, D. (2008). Functional mapping of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus capsid protein nuclear localization signal and its pathogenic association. *Virus Res* **135**(1), 107-114.
- Peng, Y. T., Chaung, H. C., Chang, H. L., Chang, H. C., et Chung, W. B. (2009). Modulations of phenotype and cytokine expression of porcine bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* **136**(3-4), 359-365.



- Perez-Martin, E., Grau-Roma, L., Argilaguet, J. M., Nofrarias, M., Escribano, J. M., Gomez-Sebastian, S., Segales, J., et Rodriguez, F. (2008). Development of two *Trichoplusia ni* larvae-derived ELISAs for the detection of antibodies against replicase and capsid proteins of porcine circovirus type 2 in domestic pigs. *J Virol Methods* **154**(1-2), 167-174.
- Pieters, M., Pijoan, C., Fano, E., et Dee, S. (2009). An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. *Vet Microbiol* **134**(3-4), 261-266.
- Piras, F., Bollard, S., Laval, F., Joisel, F., Reynaud, G., Charreyre, C., Andreoni, C., et Juillard, V. (2005). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus-specific interferon-gamma(+) T-cell responses after PRRS virus infection or vaccination with an inactivated PRRS vaccine. *Viral Immunol* **18**(2), 381-389.
- Pirzadeh, B., et Dea, S. (1997). Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J Gen Virol* **78** ( Pt 8), 1867-1873.
- Pirzadeh, B., et Dea, S. (1998). Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* **79** ( Pt 5), 989-999.
- Pitkin, A., Deen, J., et Dee, S. (2009a). Further assessment of fomites and personnel as vehicles for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res* **73**(4), 298-302.
- Pitkin, A., Deen, J., et Dee, S. (2009b). Use of a production region model to assess the airborne spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* **136**(1-2), 1-7.
- Plagemann, P. G. (2004). The primary GP5 neutralization epitope of North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* **102**(3), 263-275.
- Plagemann, P. G., Rowland, R. R., et Faaberg, K. S. (2002). The primary neutralization epitope of porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain VR-2332 is located in the middle of the GP5 ectodomain. *Arch Virol* **147**(12), 2327-2347.
- Plana Duran, J., Climent, I., Sarraseca, J., Urniza, A., Cortes, E., Vela, C., et Casal, J. I. (1997). Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. *Virus Genes* **14**(1), 19-29.
- Pogranichnyy, R. M., Yoon, K. J., Harms, P. A., Swenson, S. L., Zimmerman, J. J., et Sorden, S. D. (2000). Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol* **13**(2), 143-153.
- Pol, J. M., Wagenaar, F., et Reus, J. E. (1997). Comparative morphogenesis of three PRRS virus strains. *Vet Microbiol* **55**(1-4), 203-208.
- Prieto, C., et Castro, J. M. (2005). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenology* **63**(1), 1-16.

- Prieto, C., Martinez-Lobo, F. J., Diez-Fuertes, F., Aguilar-Calvo, P., Simarro, I., et Castro, J. M. (2011). Immunisation of pigs with a major envelope protein sub-unit vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) results in enhanced clinical disease following experimental challenge. *Vet J* **189**(3), 323-329.
- Qiao, S., Jiang, Z., Tian, X., Wang, R., Xing, G., Wan, B., Bao, D., Liu, Y., Hao, H., Guo, J., et Zhang, G. (2011). Porcine FcγRIIb mediates enhancement of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *PLoS One* **6**(12), e28721.
- Qiu, H. J., Tian, Z. J., Tong, G. Z., Zhou, Y. J., Ni, J. Q., Luo, Y. Z., et Cai, X. H. (2005). Protective immunity induced by a recombinant pseudorabies virus expressing the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglets. *Vet Immunol Immunopathol* **106**(3-4), 309-319.
- Quan, Z., Qin, Z. G., Zhen, W., Feng, X. Z., Hong, J., et Fei, Z. H. (2010). Plasmid containing CpG oligodeoxynucleotides can augment the immune responses of pigs immunized with porcine reproductive and respiratory syndrome killed virus vaccine. *Vet Immunol Immunopathol* **136**(3-4), 257-264.
- Ramamoorthy, S., et Meng, X. J. (2009). Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *Anim Health Res Rev* **10**(1), 1-20.
- Rassa, J. C., Meyers, J. L., Zhang, Y., Kudravalli, R., et Ross, S. R. (2002). Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4), 2281-2286.
- Razin, S., Yogeve, D., et Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(4), 1094-1156.
- Redondo, E., Masot, A. J., Fernandez, A., et Gazquez, A. (2009). Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Comp Pathol* **140**(4), 260-270.
- Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N., et Friede, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* **30**(1), 23-32.
- Ren, T., Zamboni, D. S., Roy, C. R., Dietrich, W. F., et Vance, R. E. (2006). Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog* **2**(3), e18.
- Roelofs, M. F., Boelens, W. C., Joosten, L. A., Abdollahi-Roodsaz, S., Geurts, J., Wunderink, L. U., Schreurs, B. W., van den Berg, W. B., et Radstake, T. R. (2006). Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol* **176**(11), 7021-7027.
- Rosa, D. S., Tzelepis, F., Cunha, M. G., Soares, I. S., et Rodrigues, M. M. (2004). The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. *Immunol Lett* **92**(3), 259-268.

- Rose, N., Larour, G., Le Diguerher, G., Eveno, E., Jolly, J. P., Blanchard, P., Oger, A., Le Dimna, M., Jestin, A., et Madec, F. (2003). Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. *Prev Vet Med* **61**(3), 209-225.
- Rosell, C., Segales, J., Ramos-Vara, J. A., Folch, J. M., Rodriguez-Arrioja, G. M., Duran, C. O., Balasch, M., Plana-Duran, J., et Domingo, M. (2000). Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec* **146**(2), 40-43.
- Rossow, K. D. (1998). Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Pathol* **35**(1), 1-20.
- Rossow, K. D., Bautista, E. M., Goyal, S. M., Molitor, T. W., Murtaugh, M. P., Morrison, R. B., Benfield, D. A., et Collins, J. E. (1994). Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J Vet Diagn Invest* **6**(1), 3-12.
- Rovira, A., Balasch, M., Segales, J., Garcia, L., Plana-Duran, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., et Domingo, M. (2002). Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol* **76**(7), 3232-3239.
- Rowland, R. R., et Yoo, D. (2003). Nucleolar-cytoplasmic shuttling of PRRSV nucleocapsid protein: a simple case of molecular mimicry or the complex regulation by nuclear import, nucleolar localization and nuclear export signal sequences. *Virus Res* **95**(1-2), 23-33.
- Royace, A. R., Husmann, R. J., Dawson, H. D., Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W. M., Zuckermann, F. A., et Lunney, J. K. (2004). Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* **102**(3), 199-216.
- Ruuth, E., et Praz, F. (1989). Interactions between mycoplasmas and the immune system. *Immunol Rev* **112**, 133-160.
- Sarli, G., Mandrioli, L., Laurenti, M., Sidoli, L., Cerati, C., Rolla, G., et Marcato, P. S. (2001). Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* **83**(1-2), 53-67.
- Sarradell, J., Andrada, M., Ramirez, A. S., Fernandez, A., Gomez-Villamandos, J. C., Jover, A., Lorenzo, H., Herraiz, P., et Rodriguez, F. (2003). A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Pathol* **40**(4), 395-404.
- Sauter, P., et Hober, D. (2009). Mechanisms and results of the antibody-dependent enhancement of viral infections and role in the pathogenesis of coxsackievirus B-induced diseases. *Microbes Infect* **11**(4), 443-451.



- Scortti, M., Prieto, C., Alvarez, E., Simarro, I., et Castro, J. M. (2007). Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. *Vet Rec* **161**(24), 809-813.
- Segales, J., Allan, G. M., et Domingo, M. (2005a). Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* **6**(2), 119-142.
- Segales, J., Alonso, F., Rosell, C., Pastor, J., Chianini, F., Campos, E., Lopez-Fuertes, L., Quintana, J., Rodriguez-Arrioja, G., Calsamiglia, M., Pujols, J., Dominguez, J., et Domingo, M. (2001). Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* **81**(1-2), 37-44.
- Segales, J., Calsamiglia, M., Olvera, A., Sibila, M., Badiella, L., et Domingo, M. (2005b). Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* **111**(3-4), 223-229.
- Segales, J., et Domingo, M. (2002). Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q* **24**(3), 109-124.
- Segales, J., Domingo, M., Chianini, F., Majo, N., Dominguez, J., Darwich, L., et Mateu, E. (2004). Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet Microbiol* **98**(2), 151-158.
- Segales, J., Urniza, A., Alegre, A., Bru, T., Crisci, E., Nofrarias, M., Lopez-Soria, S., Balasch, M., Sibila, M., Xu, Z., Chu, H. J., Fraile, L., et Plana-Duran, J. (2009). A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. *Vaccine* **27**(52), 7313-7321.
- Segura, M., Su, Z., Piccirillo, C., et Stevenson, M. M. (2007). Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression. *Eur J Immunol* **37**(7), 1887-1904.
- Seymour, L. M., Falconer, L., Deutscher, A. T., Minion, F. C., Padula, M. P., Dixon, N. E., Djordjevic, S. P., et Walker, M. J. (2011). Mhp107 is a member of the multifunctional adhesin family of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Biol Chem* **286**(12), 10097-10104.
- Seymour, L. M., Jenkins, C., Deutscher, A. T., Raymond, B. B., Padula, M. P., Tacchi, J. L., Bogema, D. R., Eamens, G. J., Woolley, L. K., Dixon, N. E., Walker, M. J., et Djordjevic, S. P. (2012). Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. *Cell Microbiol* **14**(1), 81-94.
- Shang, S. B., Jin, Y. L., Jiang, X. T., Zhou, J. Y., Zhang, X., Xing, G., He, J. L., et Yan, Y. (2009). Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2. *Mol Immunol* **46**(3), 327-334.



- Shanmugam, A., Rajoria, S., George, A. L., Mittelman, A., Suriano, R., et Tiwari, R. K. (2012). Synthetic Toll like receptor-4 (TLR-4) agonist peptides as a novel class of adjuvants. *PLoS One* 7(2), e30839.
- Sheldrake, R. F., Gardner, I. A., Saunders, M. M., et Romalis, L. F. (1990). Serum antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* measured by enzyme-linked immunosorbent assay after experimental and natural infection of pigs. *Aust Vet J* 67(2), 39-42.
- Shen, G., Jin, N., Ma, M., Jin, K., Zheng, M., Zhuang, T., Lu, H., Zhu, G., Jin, H., Jin, M., Huo, X., Qin, X., Yin, R., Li, C., Li, H., Li, Y., Han, Z., Chen, Y., et Jin, M. (2007). Immune responses of pigs inoculated with a recombinant fowlpox virus coexpressing GP5/GP3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine IL-18. *Vaccine* 25(21), 4193-4202.
- Shen, H. G., Beach, N. M., Huang, Y. W., Halbur, P. G., Meng, X. J., et Opriessnig, T. (2010). Comparison of commercial and experimental porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines using a triple challenge with PCV2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), and porcine parvovirus (PPV). *Vaccine* 28(37), 5960-5966.
- Shen, H. G., Zhou, J. Y., Huang, Z. Y., Guo, J. Q., Xing, G., He, J. L., Yan, Y., et Gong, L. Y. (2008). Protective immunity against porcine circovirus 2 by vaccination with ORF2-based DNA and subunit vaccines in mice. *J Gen Virol* 89(Pt 8), 1857-1865.
- Shi, K., Li, H., Guo, X., Ge, X., Jia, H., Zheng, S., et Yang, H. (2008). Changes in peripheral blood leukocyte subpopulations in piglets co-infected experimentally with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* 129(3-4), 367-377.
- Shi, K. C., Guo, X., Ge, X. N., Liu, Q., et Yang, H. C. (2010). Cytokine mRNA expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from piglets experimentally co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* 140(1-2), 155-160.
- Shi, X., Wang, L., Li, X., Zhang, G., Guo, J., Zhao, D., Chai, S., et Deng, R. (2011). Endoribonuclease activities of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp11 was essential for nsp11 to inhibit IFN-beta induction. *Mol Immunol* 48(12-13), 1568-1572.
- Shibata, I., Okuda, Y., Kitajima, K., et Asai, T. (2006). Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53(6), 278-280.
- Shibata, I., Okuda, Y., Yazawa, S., Ono, M., Sasaki, T., Itagaki, M., Nakajima, N., Okabe, Y., et Hidejima, I. (2003). PCR detection of Porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J Vet Med Sci* 65(3), 405-408.

- Shimoji, Y., Oishi, E., Muneta, Y., Nosaka, H., et Mori, Y. (2003). Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. *Vaccine* **21**(5-6), 532-537.
- Shortman, K., et Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2**(3), 151-161.
- Sibila, M., Mentaberre, G., Boadella, M., Huerta, E., Casas-Diaz, E., Vicente, J., Gortazar, C., Marco, I., Lavin, S., et Segales, J. (2010). Serological, pathological and polymerase chain reaction studies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in the wild boar. *Vet Microbiol* **144**(1-2), 214-218.
- Sibila, M., Nofrarias, M., Lopez-Soria, S., Segales, J., Valero, O., Espinal, A., et Calsamiglia, M. (2007). Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Vet Microbiol* **122**(1-2), 97-107.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., et Segales, J. (2009). Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet J* **181**(3), 221-231.
- Simionatto, S., Marchioro, S. B., Galli, V., Brum, C. B., Klein, C. S., Rebelatto, R., Silva, E. F., Borsuk, S., Conceicao, F. R., et Dellagostin, O. A. (2012). Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **35**(2), 209-216.
- Sinha, A., Shen, H. G., Schalk, S., Beach, N. M., Huang, Y. W., Halbur, P. G., Meng, X. J., et Opriessnig, T. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection at the time of porcine circovirus type 2 vaccination has no impact on vaccine efficacy. *Clin Vaccine Immunol* **17**(12), 1940-1945.
- Sinha, A., Shen, H. G., Schalk, S., Beach, N. M., Huang, Y. W., Meng, X. J., Halbur, P. G., et Opriessnig, T. (2011). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) influences infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) subtypes PCV2a and PCV2b by prolonging PCV2 viremia and shedding. *Vet Microbiol* **152**(3-4), 235-246.
- Sipos, W., Duvigneau, J. C., Willheim, M., Schilcher, F., Hartl, R. T., Hofbauer, G., Exel, B., Pietschmann, P., et Schmoll, F. (2004). Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection. *Vet Immunol Immunopathol* **99**(1-2), 63-71.
- Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barre, A., et Blanchard, A. (2007). Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Res Microbiol* **158**(10), 754-766.
- Sirois, J. (2007). Formation et recherche en santé animale : Préparer l'avenir de l'agriculture et de l'agroalimentaire québécois.
- Snijder, E. J., et Meulenberg, J. J. (1998). The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* **79**, 961-979.

- Snijder, E. J., et Spaan, W. J. (2007). Arteriviruses. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA ed. In "Fields virology, 5th ed." (D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus, Eds.), Vol. 1, pp. 1337-1355.
- Snoeck, V., Peters, I. R., et Cox, E. (2006). The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Vet Res* **37**(3), 455-467.
- Song, C., Krell, P., et Yoo, D. (2010). Nonstructural protein 1alpha subunit-based inhibition of NF-kappaB activation and suppression of interferon-beta production by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* **407**(2), 268-280.
- Song, Y., Jin, M., Zhang, S., Xu, X., Xiao, S., Cao, S., et Chen, H. (2007). Generation and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing cap protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* **119**(2-4), 97-104.
- Sorensen, V., Jorsal, S. V., et Mousing, J. (2006). Diseases of the respiratory system. In "Diseases of swine, 9<sup>th</sup> edition" (B.E. Straw, J. Zimmerman, S. D'Allaire, and D.J. Taylor, Eds.), pp. 149-177. Iowa State University Press.
- Spilman, M. S., Welbon, C., Nelson, E., et Dokland, T. (2009). Cryo-electron tomography of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: organization of the nucleocapsid. *J Gen Virol* **90**(Pt 3), 527-535.
- Stadejek, T., Oleksiewicz, M. B., Potapchuk, D., et Podgorska, K. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J Gen Virol* **87**(Pt 7), 1835-1841.
- Stakenborg, T., Vicca, J., Maes, D., Peeters, J., de Kruif, A., Haesebrouck, F., et Butaye, P. (2006). Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *J Microbiol Methods* **66**(2), 263-275.
- Stark, K. D. (1999). The role of infectious aerosols in disease transmission in pigs. *Vet J* **158**(3), 164-181.
- Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., et Mankertz, A. (2001). Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. *Virology* **291**(1), 152-160.
- Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., et Mankertz, A. (2006). Demonstration of nicking/joining activity at the origin of DNA replication associated with the rep and rep' proteins of porcine circovirus type 1. *J Virol* **80**(13), 6225-6234.
- Stevens, T. L., Bossie, A., Sanders, V. M., Fernandez-Botran, R., Coffman, R. L., Mosmann, T. R., et Vitetta, E. S. (1988). Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* **334**(6179), 255-258.
- Stevenson, L. S., McCullough, K., Vincent, I., Gilpin, D. F., Summerfield, A., Nielsen, J., McNeilly, F., Adair, B. M., et Allan, G. M. (2006). Cytokine and C-reactive protein profiles induced by porcine circovirus type 2 experimental infection in 3-week-old piglets. *Viral Immunol* **19**(2), 189-195.



- Stockhofe-Zurwieden, N., Navarro Camarro, J. A., Grosse-Beilage, E., Chavez, J., et Pohlenz, J. (1993). Uterine and placental alterations in pregnant sows associated with the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). *Zentralbl Veterinarmed B* **40**(4), 261-271.
- Suarez, P. (2000). Ultrastructural pathogenesis of the PRRS virus. *Vet Res* **31**(1), 47-55.
- Sullivan, N., Sun, Y., Sattentau, Q., Thali, M., Wu, D., Denisova, G., Gershoni, J., Robinson, J., Moore, J., et Sodroski, J. (1998). CD4-Induced conformational changes in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein: consequences for virus entry and neutralization. *J Virol* **72**(6), 4694-4703.
- Sun, Z., Chen, Z., Lawson, S. R., et Fang, Y. (2010). The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 2 possesses deubiquitinating and interferon antagonism functions. *J Virol* **84**(15), 7832-7846.
- Suradhat, S., et Thanawongnuwech, R. (2003). Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* **84**(Pt 10), 2755-2760.
- Suradhat, S., Thanawongnuwech, R., et Poovorawan, Y. (2003). Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* **84**(Pt 2), 453-459.
- Tajima, M., Yagihashi, T., Nunoya, T., Takeuchi, A., et Ohashi, F. (1984). Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs immunosuppressed by thymectomy and treatment with antithymocyte serum. *Am J Vet Res* **45**(10), 1928-1932.
- Takada, A., Feldmann, H., Ksiazek, T. G., et Kawaoka, Y. (2003). Antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection. *J Virol* **77**(13), 7539-7544.
- Takada, A., et Kawaoka, Y. (2003). Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications. *Rev Med Virol* **13**(6), 387-398.
- Thacker, E., et Thanawongnuwech, R. (2002). Porcine Respiratory Disease Complex. *Thai J. Vet. Med.* **32**, 125-134.
- Thacker, E. L. (2001). Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **17**(3), 551-565.
- Thacker, E. L., Halbur, P. G., Ross, R. F., Thanawongnuwech, R., et Thacker, B. J. (1999). Mycoplasma hyopneumoniae potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol* **37**(3), 620-627.
- Thacker, E. L., Thacker, B. J., Kuhn, M., Hawkins, P. A., et Waters, W. R. (2000a). Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a Mycoplasma hyopneumoniae bacterin to pigs. *Am J Vet Res* **61**(11), 1384-1389.



- Thacker, E. L., Thacker, B. J., Young, T. F., et Halbur, P. G. (2000b). Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine* **18**(13), 1244-1252.
- Thanawongnuwech, R., et Suradhat, S. (2010). Taming PRRSV: revisiting the control strategies and vaccine design. *Virus Res* **154**(1-2), 133-140.
- Thanawongnuwech, R., Thacker, B., Halbur, P., et Thacker, E. L. (2004). Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol* **11**(5), 901-908.
- Thanawongnuwech, R., et Thacker, E. L. (2003). Interleukin-10, interleukin-12, and interferon-gamma levels in the respiratory tract following mycoplasma hyopneumoniae and PRRSV infection in pigs. *Viral Immunol* **16**(3), 357-367.
- Thanawongnuwech, R., Young, T. F., Thacker, B. J., et Thacker, E. L. (2001). Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. *Vet Immunol Immunopathol* **79**(1-2), 115-127.
- Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C., Hu, Y., Chen, X., Hu, D., Tian, X., Liu, D., Zhang, S., Deng, X., Ding, Y., Yang, L., Zhang, Y., Xiao, H., Qiao, M., Wang, B., Hou, L., Wang, X., Yang, X., Kang, L., Sun, M., Jin, P., Wang, S., Kitamura, Y., Yan, J., et Gao, G. F. (2007). Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS One* **2**(6), e526.
- Tian, X., Lu, G., Gao, F., Peng, H., Feng, Y., Ma, G., Bartlam, M., Tian, K., Yan, J., Hilgenfeld, R., et Gao, G. F. (2009). Structure and cleavage specificity of the chymotrypsin-like serine protease (3CLSP/nsp4) of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). *J Mol Biol* **392**(4), 977-993.
- Tirado, S. M., et Yoon, K. J. (2003). Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunol* **16**(1), 69-86.
- Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., et Koch, M. A. (1982). A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* **295**(5844), 64-66.
- Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M., et Griem, W. (1986). Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol* **91**(3-4), 271-276.
- Tischer, I., Rasch, R., et Tochtermann, G. (1974). Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Orig A* **226**(2), 153-167.
- Torremorell, M., et al. (2004). Evaluation of PRRSV outbreaks in negative herds. In "18e Congrès de la Société internationale de médecine vétérinaire porcine", Hambourg, Allemagne.

- Torres, J. M., Alonso, C., Ortega, A., Mittal, S., Graham, F., et Enjuanes, L. (1996). Tropism of human adenovirus type 5-based vectors in swine and their ability to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Virol* **70**(6), 3770-3780.
- Tritto, E., Mosca, F., et De Gregorio, E. (2009). Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine* **27**(25-26), 3331-3334.
- Tsuji, N., Suzuki, K., Kasuga-Aoki, H., Matsumoto, Y., Arakawa, T., Ishiwata, K., et Isobe, T. (2001). Intranasal immunization with recombinant *Ascaris suum* 14-kilodalton antigen coupled with cholera toxin B subunit induces protective immunity to *A. suum* infection in mice. *Infect Immun* **69**(12), 7285-7292.
- Tutykhina, I. L., Logunov, D. Y., Shcherbinin, D. N., Shmarov, M. M., Tukhvatulin, A. I., Naroditsky, B. S., et Gintsburg, A. L. (2011). Development of adenoviral vector-based mucosal vaccine against influenza. *J Mol Med (Berl)* **89**(4), 331-341.
- Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Asford, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J. W., Pascual, V., Palucka, A. K., et Banchereau, J. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* **219**, 118-142.
- Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C. J., Hacker, H., et Wagner, H. (2001). Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* **276**(33), 31332-31339.
- Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C. J., Issels, R. D., et Wagner, H. (2002). HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* **277**(17), 15107-15112.
- Van Alstine, W. G., Stevenson, G. W., et Kanitz, C. L. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not exacerbate *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in young pigs. *Vet Microbiol* **49**(3-4), 297-303.
- Van Breedam, W., Van Gorp, H., Zhang, J. Q., Crocker, P. R., Delpitte, P. L., et Nauwynck, H. J. (2010). The M/GP(5) glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLoS Pathog* **6**(1), e1000730.
- Van Gorp, H., Van Breedam, W., Delpitte, P. L., et Nauwynck, H. J. (2008). Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* **89**(Pt 12), 2943-2953.
- Van Reeth, K. (1997). Pathogenesis and clinical aspects of a respiratory porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Microbiol* **55**(1-4), 223-230.
- Van Reeth, K., Labarque, G., Nauwynck, H., et Pensaert, M. (1999). Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res Vet Sci* **67**(1), 47-52.

- Van Reeth, K., Nauwynck, H., et Pensaert, M. (1996). Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Vet Microbiol* **48**(3-4), 325-335.
- Van Reeth, K., Van Gucht, S., et Pensaert, M. (2002). In vivo studies on cytokine involvement during acute viral respiratory disease of swine: troublesome but rewarding. *Vet Immunol Immunopathol* **87**(3-4), 161-168.
- Vanderheijden, N., Delputte, P. L., Favoreel, H. W., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., van Woensel, P. A., et Nauwynck, H. J. (2003). Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol* **77**(15), 8207-8215.
- Vanhee, M., Delputte, P. L., Delrue, I., Geldhof, M. F., et Nauwynck, H. J. (2009). Development of an experimental inactivated PRRSV vaccine that induces virus-neutralizing antibodies. *Vet Res* **40**(6), 63.
- Vashisht, K., Goldberg, T. L., Husmann, R. J., Schnitzlein, W., et Zuckermann, F. A. (2008). Identification of immunodominant T-cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* **26**(36), 4747-4753.
- Verheije, M. H., Welting, T. J., Jansen, H. T., Rottier, P. J., et Meulenberg, J. J. (2002). Chimeric arteriviruses generated by swapping of the M protein ectodomain rule out a role of this domain in viral targeting. *Virology* **303**(2), 364-373.
- Vezina, S. A., Loemba, H., Fournier, M., Dea, S., et Archambault, D. (1996). Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res* **60**(2), 94-99.
- Vicca, J., Stakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J., de Kruif, A., et Haesebrouck, F. (2003). Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet Microbiol* **97**(3-4), 177-190.
- Villadangos, J. A., et Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* **7**(7), 543-555.
- Vincent, I. E., Carrasco, C. P., Guzylack-Piriou, L., Herrmann, B., McNeilly, F., Allan, G. M., Summerfield, A., et McCullough, K. C. (2005). Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology* **115**(3), 388-398.
- Vincent, I. E., Carrasco, C. P., Herrmann, B., Meehan, B. M., Allan, G. M., Summerfield, A., et McCullough, K. C. (2003). Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J Virol* **77**(24), 13288-13300.



- Vu, H. L., Kwon, B., Yoon, K. J., Laegreid, W. W., Pattnaik, A. K., et Osorio, F. A. (2011). Immune evasion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through glycan shielding involves both glycoprotein 5 as well as glycoprotein 3. *J Virol* **85**(11), 5555-5564.
- Wallgren, P., Bolske, G., Gustafsson, S., Mattsson, S., et Fossum, C. (1998). Humoral immune responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* in sows and offspring following an outbreak of mycoplasmosis. *Vet Microbiol* **60**(2-4), 193-205.
- Wang, D., Lou, J., Ouyang, C., Chen, W., Liu, Y., Liu, X., Cao, X., Wang, J., et Lu, L. (2010). Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(31), 13806-13811.
- Wang, F., Guo, X., Ge, X., Wang, Z., Chen, Y., Cha, Z., et Yang, H. (2009a). Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Res* **145**(1), 151-156.
- Wang, S., Fang, L., Fan, H., Jiang, Y., Pan, Y., Luo, R., Zhao, Q., Chen, H., et Xiao, S. (2007a). Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* **25**(49), 8220-8227.
- Wang, X., Eaton, M., Mayer, M., Li, H., He, D., Nelson, E., et Christopher-Hennings, J. (2007b). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. *Arch Virol* **152**(2), 289-303.
- Wang, X., Jiang, P., Li, Y., Jiang, W., et Dong, X. (2007c). Protection of pigs against post-weaning multisystemic wasting syndrome by a recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* **121**(3-4), 215-224.
- Wang, X., Jiang, W., Jiang, P., Li, Y., Feng, Z., et Xu, J. (2006). Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice. *Vaccine* **24**(16), 3374-3380.
- Wang, X., Li, J., Jiang, P., Li, Y., Zeshan, B., Cao, J., et Wang, X. (2009b). GM-CSF fused with GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus increased the immune responses and protective efficacy against virulent PRRSV challenge. *Virus Res* **143**(1), 24-32.
- Wang, X., Li, Y., et Jiang, P. (2009c). [Construction and immunogenicity of recombinant adenoviruses expressing Cap protein of PCV2 and GP5 protein of PRRSV in mice]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **25**(11), 1639-1645.
- Wang, Y., Liang, Y., Han, J., Burkhart, K. M., Vaughn, E. M., Roof, M. B., et Faaberg, K. S. (2008). Attenuation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain MN184 using chimeric construction with vaccine sequence. *Virology* **371**(2), 418-429.



- Wang, Y. X., Zhou, Y. J., Li, G. X., Zhang, S. R., Jiang, Y. F., Xu, A. T., Yu, H., Wang, M. M., Yan, L. P., et Tong, G. Z. (2011). Identification of immunodominant T-cell epitopes in membrane protein of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* **158**(1-2), 108-115.
- Weber, J. M. (2003). Adenain, the adenovirus endoprotease (a review). *Acta Microbiol Immunol Hung* **50**(1), 95-101.
- Welch, S. K., Jolie, R., Pearce, D. S., Koertje, W. D., Fuog, E., Shields, S. L., Yoo, D., et Calvert, J. G. (2004). Construction and evaluation of genetically engineered replication-defective porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine candidates. *Vet Immunol Immunopathol* **102**(3), 277-290.
- Wensvoort, G. (1993). Lelystad virus and the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. *Vet Res* **24**(2), 117-124.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J. M., ter Laak, E. A., Bloemraad, M., de Kluyver, E. P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., et et al. (1991). Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q* **13**(3), 121-130.
- Wesley, R. D., Lager, K. M., et Kehrli, M. E., Jr. (2006). Infection with Porcine reproductive and respiratory syndrome virus stimulates an early gamma interferon response in the serum of pigs. *Can J Vet Res* **70**(3), 176-182.
- Wills, R. W., Zimmerman, J. J., Yoon, K. J., Swenson, S. L., Hoffman, L. J., McGinley, M. J., Hill, H. T., et Platt, K. B. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet Microbiol* **57**(1), 69-81.
- Wilton, J., Jenkins, C., Cordwell, S. J., Falconer, L., Minion, F. C., Oneal, D. C., Djordjevic, M. A., Connolly, A., Barchia, I., Walker, M. J., et Djordjevic, S. P. (2009). Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Microbiol* **71**(3), 566-582.
- Wilton, J. L., Scarman, A. L., Walker, M. J., et Djordjevic, S. P. (1998). Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology* **144** ( Pt 7), 1931-1943.
- Wissink, E. H., Kroese, M. V., Maneschijn-Bonsing, J. G., Meulenberg, J. J., van Rijn, P. A., Rijsewijk, F. A., et Rottier, P. J. (2004). Significance of the oligosaccharides of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP2a and GP5 for infectious virus production. *J Gen Virol* **85**(Pt 12), 3715-3723.
- Wissink, E. H., Kroese, M. V., van Wijk, H. A., Rijsewijk, F. A., Meulenberg, J. J., et Rottier, P. J. (2005). Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol* **79**(19), 12495-12506.

- Woodbine, K. A., Medley, G. F., Slevin, J., Kilbride, A. L., Novell, E. J., Turner, M. J., Keeling, M. J., et Green, L. E. (2007). Spatiotemporal patterns and risks of herd breakdowns in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec* **160**(22), 751-762.
- Wootton, S. K., Rowland, R. R., et Yoo, D. (2002). Phosphorylation of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein. *J Virol* **76**(20), 10569-10576.
- Wootton, S. K., et Yoo, D. (2003). Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages. *J Virol* **77**(8), 4546-4557.
- Wu, W. H., Fang, Y., Rowland, R. R., Lawson, S. R., Christopher-Hennings, J., Yoon, K. J., et Nelson, E. A. (2005). The 2b protein as a minor structural component of PRRSV. *Virus Res* **114**(1-2), 177-181.
- Xiao, Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., et Murtaugh, M. P. (2004). The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J Virol* **78**(11), 5923-5933.
- Xue, Q., Zhao, Y. G., Zhou, Y. J., Qiu, H. J., Wang, Y. F., Wu, D. L., Tian, Z. J., et Tong, G. Z. (2004). Immune responses of swine following DNA immunization with plasmids encoding porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORFs 5 and 7, and porcine IL-2 and IFN $\gamma$ . *Vet Immunol Immunopathol* **102**(3), 291-298.
- Yang, J. S., Song, D. S., Kim, S. Y., Lyoo, K. S., et Park, B. K. (2003). Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with or without enteric disease by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* **15**(4), 369-373.
- Yang, L., Frey, M. L., Yoon, K. J., Zimmerman, J. J., et Platt, K. B. (2000). Categorization of North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses: epitopic profiles of the N, M, GP5 and GP3 proteins and susceptibility to neutralization. *Arch Virol* **145**(8), 1599-1619.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S., et Sher, A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* **308**(5728), 1626-1629.
- Yoo, D., Song, C., Sun, Y., Du, Y., Kim, O., et Liu, H. C. (2010). Modulation of host cell responses and evasion strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* **154**(1-2), 48-60.
- Yoo, D., Welch, S. K., Lee, C., et Calvert, J. G. (2004). Infectious cDNA clones of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and their potential as vaccine vectors. *Vet Immunol Immunopathol* **102**(3), 143-154.
- Yoon, K. J., Wu, L. L., Zimmerman, J. J., Hill, H. T., et Platt, K. B. (1996). Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. *Viral Immunol* **9**(1), 51-63.

- Yoon, K. J., Wu, L. L., Zimmerman, J. J., et Platt, K. B. (1997). Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection. *Vet Microbiol* **55**(1-4), 277-287.
- Zhang, D., Xia, Q., Wu, J., Liu, D., Wang, X., et Niu, Z. (2011a). Construction and immunogenicity of DNA vaccines encoding fusion protein of murine complement C3d-p28 and GP5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* **29**(4), 629-635.
- Zhang, H., Lunney, J. K., Baker, R. B., et Opriessnig, T. (2011b). Cytokine and chemokine mRNA expression profiles in tracheobronchial lymph nodes from pigs singularly infected or coinfectd with porcine circovirus type 2 (PCV2) and *Mycoplasma hyopneumoniae* (MHYO). *Vet Immunol Immunopathol* **140**(1-2), 152-158.
- Zhang, L., Tian, X., et Zhou, F. (2007). Intranasal administration of CpG oligonucleotides induces mucosal and systemic Type 1 immune responses and adjuvant activity to porcine reproductive and respiratory syndrome killed virus vaccine in piglets in vivo. *Int Immunopharmacol* **7**(13), 1732-1740.
- Zhang, Q., Young, T. F., et Ross, R. F. (1995). Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect Immun* **63**(3), 1013-1019.
- Zheng, H., Punaro, M. C., Segura, M., Lachance, C., Rivest, S., Xu, J., Houde, M., et Gottschalk, M. (2011). Toll-like receptor 2 is partially involved in the activation of murine astrocytes by *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent of meningitis. *J Neuroimmunol* **234**(1-2), 71-83.
- Zheng, Q., Chen, D., Li, P., Bi, Z., Cao, R., Zhou, B., et Chen, P. (2007). Co-expressing GP5 and M proteins under different promoters in recombinant modified vaccinia virus ankara (rMVA)-based vaccine vector enhanced the humoral and cellular immune responses of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Genes* **35**(3), 585-595.
- Zhou, J. X., Xue, J. D., Yu, T., Zhang, J. B., Liu, Y., Jiang, N., Li, Y. L., et Hu, R. L. (2010). Immune responses in pigs induced by recombinant canine adenovirus 2 expressing the glycoprotein 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Res Commun* **34**(4), 371-380.
- Zhou, J. Y., Shang, S. B., Gong, H., Chen, Q. X., Wu, J. X., Shen, H. G., Chen, T. F., et Guo, J. Q. (2005). In vitro expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal. *J Biotechnol* **118**(2), 201-211.
- Zhu, J., Huang, X., et Yang, Y. (2007). Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways. *J Virol* **81**(7), 3170-3180.
- Zielinski, G. C., et Ross, R. F. (1990). Effect of growth in cell cultures and strain on virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* for swine. *Am J Vet Res* **51**(3), 344-348.

- Zielinski, G. C., et Ross, R. F. (1993). Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. *Am J Vet Res* **54**(8), 1262-1269.
- Zuckermann, F. A., Garcia, E. A., Luque, I. D., Christopher-Hennings, J., Doster, A., Brito, M., et Osorio, F. (2007). Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Vet Microbiol* **123**(1-3), 69-85.